

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA

FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA

IMPLICACIÓN DE LA CADERINA DEL  
ENDOTELIO VASCULAR EN LA REGULACIÓN  
DE LA PERMEABILIDAD VASCULAR Y SU  
RELACIÓN CON EL SÍNDROME DE  
HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA

TESIS DOCTORAL

Reg. F.M. 25.103



AMPARO VILLASANTE MORÁN

Madrid, 2005

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA MADRID  
REGISTRO GENERAL

Entrada 01 Nº. 200500004462  
11/04/05 16:16:28

Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la  
fecha, acordó calificar la presente Tesis Doctoral  
con la censura de Señalando con tanto por una  
Madrid, 8-Julio-05

Mun

Thall

grrr

grrr



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA**  
**HOSPITAL LA PAZ**

**IMPLICACIÓN DE LA CADERINA DEL  
ENDOTELIO VASCULAR EN LA REGULACIÓN  
DE LA PERMEABILIDAD VASCULAR Y SU  
RELACIÓN CON EL SÍNDROME DE  
HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA**

**MEMORIA**

presentada para optar al grado de Doctor por la UAM por

**Amparo Villasante Morán**

Madrid, 2005

DIRECTOR: **Antonio GONZÁLEZ GONZÁLEZ**, Doctor en Medicina y Cirugía, Catedrático y Jefe del Departamento de Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

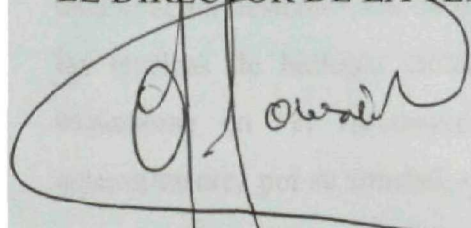
CO-DIRECTOR: **Juan Antonio GARCÍA VELASCO**, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor Asociado del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Rey Juan Carlos y Director del Instituto Valenciano de Infertilidad de Madrid.

CERTIFICAN: Que Doña Amparo Villasante Morán ha realizado bajo nuestra dirección la Tesis Doctoral: **"IMPLICACIÓN DE LA CADERINA DEL ENDOTELIO VASCULAR EN LA REGULACIÓN DE LA PERMEABILIDAD VASCULAR Y SU RELACIÓN CON EL SÍNDROME DE HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA"**, necesaria para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía. Revisado el presente trabajo, autorizamos la presentación de la citada Tesis Doctoral en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

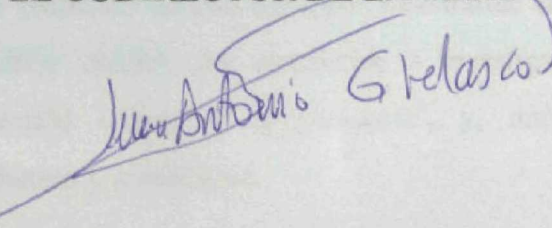
Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Madrid, a 28 de Marzo de 2005.

EL DIRECTOR DE LA TESIS

EL CODIRECTOR DE LA TESIS



Fdo: Antonio González González



Fdo: Juan Antonio García Velasco



## AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Doctor Don **Antonio González González**, director de esta tesis, por su constante estímulo en mi formación como residente, por su apoyo, su cariño y su fe incondicional en mí.

Al Profesor Doctor Don **Juan Antonio García Velasco**, codirector de esta tesis, por su constante apoyo, continua motivación, permanente interés y ayuda científica, sin los cuales no solo este trabajo no habría visto la luz, sino que además difícilmente me hubiera iniciado en la investigación.

A todo el **Departamento de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario La Paz**, con el Profesor Doctor Don **Juan Ordás Santo Tomás** al frente, por haberme acogido durante mi formación de especialista y enseñarme lo que sé sobre Ginecología Funcional.

Al Doctor Don **Antonio Pérez Piñar**, por su tremendo y entusiasta esfuerzo en la formación de los residentes, por enseñarme una forma de vivir y de trabajar, y muy especialmente, por la generosidad de su corazón y mente que nunca tuvieron límites.

Al Profesor Doctor Don **Antonio Pellicer Martínez**, al Profesor Doctor Don **José Remohí Jiménez**, y al Profesor Doctor Don **Carlos Simón Vallés**, por contagiarme su entusiasmo por la reproducción humana y, muy especialmente, por encaminar mi atención hacia la investigación.

Al Profesor Doctor Don **Alberto Pacheco Castro**, por su total disponibilidad y colaboración desinteresada en el desarrollo científico de esta tesis, por adiestrarme en las técnicas de biología molecular y cultivo celular, por enseñarme a investigar basándome en “el razonamiento, el sentido común y la paciencia”, y, muy especialmente, por su amistad, sentido del humor y amabilidad.



A todos los departamentos del **Instituto Valenciano de Infertilidad en Madrid**, por su apoyo constante, comprensión y cariño y, en especial, a mis compañeros ginecólogos, los Doctores **Antonio Requena Miranda, Francisco Javier Martínez-Salazar Romero, Juan Manuel Giles Jiménez, Alfredo Guillén Antón, Susana Rabadán Sevilla, José Serna López, José Manuel Puente Águeda y Ángel Grañeras Aparicio**, por su amistad, paciencia y colaboración siempre que lo he necesitado.

Al Doctor Don **Eduardo José Cabrillo Rodríguez** y al Doctor Don **Fernando Magdaleno Dans**, por su apoyo y ayuda en la recogida de las muestras empleadas para la realización de este trabajo en el **Servicio de Obstetricia del Hospital Universitario La Paz**.

Al Doctor Don **Raúl Gómez Gallego** y a la Doctora Doña **Elena Pau Espinosa**, por sus buenos consejos y colaboración en la recogida de muestras desde el **Instituto Valenciano de Infertilidad en Valencia**.

A **María del Carmen Anarte Jimeno, Nuria García Torres, Ana Isabel Molinero Ballesteros y Jaime Hermoso González**, por su gran ayuda en el **Laboratorio de Andrología del Instituto Valenciano de Infertilidad en Madrid** y, muy especialmente, por su espontaneidad, buen humor y alegría contagiosa.

Al Doctor Don **Carlos M. Hortelano Tévar**, por su colaboración en la interpretación estadística de los resultados, y por su buen hacer y optimismo en los momentos bajos.

Al Doctor Don **Víctor Andrés Zúñiga Escobar**, por su ayuda al comienzo de este trabajo y su apoyo constante desde la distancia.

A mis queridas amigas **Alicia Hernández Gutiérrez, Yolanda Pérez Martínez, Mar Muñoz Muñiz, María Serrano Velasco, Sonia Lobo Martínez, María Esther Guerrero Martín, María Magdalena Hawkins Solís, Adriana Landazábal Bernal y Teresa de Jesús Blanco Asensi**, por estar siempre a mi lado, por creer en mí y dar sentido a la palabra amistad.

A mis padres y Aitor, por absolutamente todo.



# ÍNDICE

<b>INDICE DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>4</b>
<b>SÍNDROME DE HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA .....</b>	<b>5</b>
1. Etiología .....	6
2. Fisiopatología .....	7
3. Cambios hemodinámicos .....	15
4. Origen de la ascitis .....	16
5. Manifestaciones clínicas y clasificación del SHO .....	17
5.1. Presentaciones infrecuentes del SHO .....	20
6. Reducción de la implantación embrionaria .....	21
7. Factores de riesgo para el SHO .....	22
8. Prevención .....	25
9. Tratamiento .....	34
10. Resultados obstétricos de las pacientes con SHO .....	38
11. Conclusiones sobre el SHO .....	39
<b>PROTEÍNAS DE ADHESIÓN CELULAR: PAPEL DE LA</b>	
<b>CADERINA DEL ENDOTELIO VASCULAR .....</b>	<b>40</b>
1. Uniones adherentes .....	42
2. La familia de las caderinas .....	44
3. Caderina EV y permeabilidad vascular: papel del VEGF,	
la histamina y la fibrina .....	50
4. Otras funciones de la caderina del endotelio vascular .....	58
4.1. Vasculogénesis embrionaria .....	58
4.2. Participación de la caderina EV en la angiogénesis .....	59
4.3. Caderina EV y apoptosis endotelial .....	62
4.4. Implicación de la caderina EV en las lesiones	
vasculares de la diabetes .....	64
<b>OBJETIVOS / HIPÓTESIS DE TRABAJO .....</b>	<b>67</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>70</b>
1. Diseño experimental .....	71
2. Productos químicos empleados .....	72
3. Aislamiento de las células y técnica del cultivo celular .....	73
4. Experimentos dosis – respuesta y de cinética temporal .....	74
5. Comprobación de la viabilidad y proliferación celular .....	75
6. Cambios de la morfología celular inducidos por los estímulos .....	76
7. Experimentos de permeabilidad funcional .....	77
8. Síndrome de hiperestimulación ovárica temprano .....	79
9. Síndrome de hiperestimulación ovárica tardío .....	84
10. Ensayo de inmunoabsorbancia ligado a enzima .....	86
11. Análisis estadístico .....	88



<b>RESULTADOS</b>	<b>89</b>
1. Secreción de caderina EV por los cultivos HUVEC	90
2. Estudio de la viabilidad y la proliferación celular de HUVEC	98
3. Experimentos de permeabilidad: Cambios de la morfología celular	102
4. Estudios de permeabilidad funcional de la monocapa HUVEC	105
5. Síndrome de hiperestimulación ovárica temprano	109
6. Síndrome de hiperestimulación ovárica tardío	114
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>117</b>
a) De los factores implicados en la fisiopatología del SHO	118
b) De la implicación del VEGF en el origen de la ascitis y derrame pleural durante varios procesos ováricos	120
c) Del papel del endotelio en la fisiopatología del SHO	124
d) Del modelo <i>in vitro</i> del SHO	126
e) De la modificación de la caderina EV sometida al estímulo con E <sub>2</sub> , hCG y VEGF	128
f) De la modificación del citoesqueleto tras la alteración de la caderina EV	131
g) Del VEGF como responsable del incremento de la permeabilidad endotelial	133
h) De la modificación de la caderina EV en el modelo <i>in vivo</i> de hiperestimulación ovárica	134
i) De la participación de la caderina EV en el SHO tardío	137
j) De los que está aún por investigar	139
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>141</b>
<b>APÉNDICE</b>	<b>145</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>149</b>



## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AJ	uniones adherentes
Ang	angiotensina II
ANOVA	análisis de la varianza
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
Bcl-2	<i>B cell lymphoma/leucemia-2</i>
$\beta$ -hCG	Fracción beta de la gonadotropina coriónica humana
cm	centímetros
DMEM	medio de Eagle modificado por Dulbecco
DSC	desmocolina
DSG	desmogleína
E <sub>2</sub>	estradiol
EDTA	etilen diamino tetraacético
EGF	factor de crecimiento epidérmico
ELISA	ensayo de inmunoabsorbencia ligado a enzima
EV	endotelio vascular
Fig	figura
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FIV	fecundación <i>in vitro</i>
FGF	factor de crecimiento de los fibroblastos
FSH	hormona folículo estimulante
FSHr	hormona folículo estimulante recombinante
FIV	fecundación in vitro
GJ	uniones comunicantes
GnRH	hormona liberadora de gonadotropinas
gr	gramos
hCG	gonadotropina coriónica humana
HMG	gonadotropina menopáusica humana
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
HUVEC	células del endotelio de vena umbilical humana
ICAM	molécula de adhesión intercelular
IGF-1	factor de crecimiento tipo insulina-1
IL	interleuquina
IM	intramuscular
IMC	índice de masa corporal
iv	intravenoso
JAM	moléculas de la adhesión de las uniones
kD	kilodalton
kg	kilogramo
LH	hormona luteinizante
LHr	hormona luteinizante recombinante
mEq	miliequivalente
mg	miligramo
mL	mililitro
mm	milímetro
MMP	metaloproteinasas de la matriz
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide
ng	nanogramo



---

nm	nanómetro
ns	no significativo
OR	odds ratio
PBS	salino fosfato balanceado
PECAM	molécula de adhesión celular endotelial / plaquetaria
pg	picogramos
PG	prostaglandinas
PGA	productos de glicosilación avanzada
SHO	síndrome de hiperestimulación ovárica
SOP	síndrome de ovarios poliquísticos
sVEGFR	receptor soluble del factor de crecimiento del endotelio vascular
TJ	uniones estrechas
TNF	factor de necrosis tumoral
TRA	técnicas de reproducción asistida
TRITC	isotiocianato tetrametilrodamina
TSH	hormona estimulante del tiroides
UI	unidades internacionales
VCAM	molécula de adhesión celular vascular
VEGF	factor de crecimiento del endotelio vascular
VEGFR-2	receptor-2 del factor de crecimiento del endotelio vascular
ZO	zona ocluyente
µg	microgramo
µm	micra





## SÍNDROME DE HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA

El síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO) es una complicación iatrogénica de los tratamientos que se emplean en las técnicas de reproducción asistida (TRA). Todavía hoy, los mecanismos fisiopatológicos que desencadenan el síndrome resultan desconocidos. La identificación de pacientes en riesgo y la puesta en marcha de diversas medidas de prevención pueden ayudarnos a evitar esta grave complicación. El manejo adecuado del SHO tiene implicaciones importantes para evitar la morbilidad grave e incluso la muerte asociada con las formas más severas de este síndrome.

Entre el 0.1% al 2% de las pacientes desarrollan formas severas del SHO [1], pero la expansión de las TRA ha provocado un incremento de los casos en todo el mundo. El SHO se produce como consecuencia de la administración exógena de citrato de clomifeno o gonadotropinas para la inducción de la ovulación. Estos tratamientos reanudan la ovulación en pacientes anovuladoras a través de la inducción farmacológica de dos o tres folículos. Pero el SHO se desarrolla más frecuentemente en la hiperestimulación ovárica controlada de pacientes sometidas a TRA. Con este tratamiento se pretende incrementar la cohorte de folículos que alcanzan la maduración en mujeres normovuladoras. Sin embargo, algunas formas de SHO tienen un origen diferente a la estimulación exógena con gonadotropinas. Esto puede ocurrir en aquellas situaciones en las que existe un estímulo ovárico endógeno, por ejemplo:

- 1) En mujeres gestantes con síndrome de ovario poliquístico (SOP), más sensibles al estímulo endógeno de las gonadotropinas, probablemente potenciado por ciertas citoquinas y factores de crecimiento [2].
- 2) En gestaciones que presentan niveles altos de gonadotropina coriónica humana (hCG) como la enfermedad trofoblástica [3, 4].
- 3) En pacientes con hipotiroidismo primario sometidas al estímulo de niveles elevados de hormona estimulante del tiroides (TSH) sobre el receptor de la hormona folículo estimulante (FSH), que puede contribuir a la hiperestimulación espontánea [5, 6].



- 4) Los adenomas gonadotropos pueden inducir la secreción de FSH y hormona luteinizante (LH), y en consecuencia elevar los niveles de estradiol y aumentar el tamaño de los ovarios, pero normalmente no se acompaña de ascitis [7, 8, 9].

Todos estos cuadros clínicos ilustran como el estímulo de las gonadotropinas es esencial en el mecanismo fisiopatológico del SHO.

El SHO es autolimitado en el tiempo, ya que con la luteólisis y llegada de la menstruación el síndrome desaparece. Aunque desconocemos con exactitud su fisiopatología, sabemos que se relaciona con la liberación de sustancias vasoactivas que actúan sobre las células endoteliales, aumentando la permeabilidad capilar sistémica y produciendo un exudado masivo rico en proteínas que crea un tercer espacio. Se observa edema, ascitis, derrame pleural y pericárdico, desequilibrio hidroelectrolítico (hiponatremia e hipercalcemia), depleción intravascular, hemoconcentración, fenómenos tromboembólicos y afectación de los órganos sensibles a la hipovolemia que puede llegar a poner en peligro la vida de la paciente [10].

## 1. ETIOLOGÍA

La etiología del SHO es todavía desconocida. Existen múltiples variables relacionadas directamente con este síndrome, pero es la hCG, tanto exógena como endógena (enfermedad trofoblástica, embarazo múltiple), el factor desencadenante del SHO. La no administración de la hCG evita el SHO y la administración de progesterona, como soporte de la fase lútea en lugar de la hCG, ha disminuido la incidencia del SHO, manteniendo buenas tasas de gestación [11, 12]. Si la hCG se emplea para el soporte de la fase lútea, el riesgo de SHO aumenta.

Existen dos patrones diferentes en el inicio del SHO: **temprano**, que se inicia entre los 3 a 7 días después de la administración de hCG y el **tardío**, de 12 a 17 días tras la administración de hCG. Esto sugiere que pueden existir dos mecanismos para la inducción del SHO:

- El **SHO temprano** se produce por el efecto de la hCG exógena empleada para inducir la ovulación, y puede aparecer en pacientes que no consiguen gestación.



- El **SHO tardío** se produce por la hCG endógena procedente del sincitiotrofoblasto de la gestación. Este síndrome se resuelve si la gestación se interrumpe, lo que apoya la hipótesis de la hCG endógena. Es raro que un SHO tardío se presente de manera primaria; es más frecuente que lo haga complicando un síndrome temprano, por lo que algunos grupos se han planteado que se trata de una misma enfermedad con dos fases; la primera dependiente de la hCG ovulatoria y la segunda de la hCG producida por el trofoblasto.

Parece claro que ciertas sustancias sintetizadas en exceso por el ovario durante la inducción de la ovulación inician una cascada de eventos que producen este síndrome.

Las investigaciones más recientes señalan a determinadas sustancias vasoactivas, porque son los cambios vasculares los que inician y mantienen los síntomas y signos que caracterizan al síndrome de hiperestimulación. De este modo, la hCG puede inducir la liberación de un mediador con efecto directo y potente sobre el sistema vascular, responsable final de la fisiopatología y consecuencias clínicas del SHO [13].

## 2. FISIOPATOLOGÍA

### 2.1. ESTRADIOL

La elevación del estradiol sérico ha sido implicada como factor desencadenante del aumento de la permeabilidad capilar. Aunque las concentraciones altas de estradiol son capaces de aumentar la permeabilidad capilar en el útero y los ovarios, éste no puede ser el único mediador de la hCG, ya que las dosis elevadas de estradiol por sí mismas no son capaces de inducir el SHO [14].

En la clínica se observa que cuando los niveles de estradiol son elevados, si no se administra hCG, generalmente no se observa síndrome de hiperestimulación. Además, en pacientes con niveles bajos de estradiol secundario a un déficit enzimático (Ej., la deficiencia de la enzima 17,20 desmolasa [15]) se diagnostica el síndrome de hiperestimulación con ascitis, lo que demuestra la hipótesis de que el estradiol no es el único mediador de la hCG.



La hiperestrogenemia podría contribuir al establecimiento de un estado de hipercoagulabilidad y trombogénesis, pero el estradiol no produce aumento de la permeabilidad vascular como demostraron Albert *et al* [16]. El estradiol tampoco está directamente implicado como factor de riesgo independiente en la fisiología del síndrome.

Los niveles elevados de estradiol en pacientes con adenomas gonadotropos son secundarios a la secreción de LH y FSH [7, 8, 9]. En estas pacientes se observan los ovarios aumentados de tamaño, pero no se desencadenan ni ascitis ni otra sintomatología típica del aumento de la permeabilidad capilar, lo que confirma que el estradiol elevado de forma aislada no induce el desarrollo del SHO.

## 2.2. HISTAMINAS

Como resultado de los trabajos de Knox *et al* [17], se postuló que las histaminas eran posibles mediadores de la hCG. Trabajos posteriores han mostrado que no hay ningún efecto beneficioso al usar bloqueantes de los receptores H1, descartando el papel de la serotonina en la patogénesis del SHO [18].

## 2.3. PROSTAGLANDINAS

El papel de estas sustancias como desencadenantes del síndrome de hiperestimulación todavía no ha sido demostrado. Se han detectado niveles elevados de prostaglandinas ya que el estradiol y la angiotensina II (AII), que se encuentran elevados en el SHO, estimulan su producción. La administración de indometacina (inhibidor de la síntesis de prostaglandinas) no mejora los síntomas de las pacientes con síndrome de hiperestimulación severo [19]. Los prometedores resultados obtenidos en conejos no se han confirmado en los ensayos realizados en humanos [20]. Además, su empleo aumenta el riesgo de un fallo renal severo al intervenir sobre la hemodinámica renal [10]. Balasch *et al* [21] ya demostraron que en las pacientes hiperestimuladas se observa un aumento en la excreción urinaria de prostaglandinas, con el objetivo de antagonizar los sistemas de vasoconstricción que se ponen en marcha durante el SHO.



## 2.4. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA OVÁRICO

Este sistema juega un papel en la fisiología ovárica. Junto a otros reguladores intraováricos, la AII participa en la modulación de la esteroidogénesis durante la foliculogénesis y atresia, y en el proceso complejo de la maduración ovocitaria y la ovulación [22]. Las propiedades vasoactivas de la AII, la detección de AII en el líquido folicular y el incremento de la concentración en respuesta a la administración exógena de hCG convierten a este sistema en uno de los posibles desencadenantes del síndrome de hiperestimulación [22, 23].

La reciente descripción de niveles elevados de renina y aldosterona durante el SHO espontáneo, apoyan el papel de este sistema en la patogénesis del SHO [24]. Navot *et al* [25] demostraron que existía una correlación directa entre la actividad plasmática de la renina y el grado de severidad del SHO. Estos niveles elevados de renina y AII en plasma y en líquido ascítico de estas pacientes parecen tener un origen ovárico.

Recientemente, se ha demostrado en conejos que los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina disminuyen un 40% la incidencia de SHO, por tanto, confirman la participación de este sistema en la fisiopatología del SHO [26]. Ando *et al* [27] observaron que el tratamiento de cuatro pacientes, con riesgo de hiperestimulación, con un inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina junto a un bloqueante del receptor de la AII consiguió que no desarrollasen ascitis y normalizó parámetros plasmáticos como el hematocrito.

## 2.5. FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR (VEGF)

El VEGF es la citoquina que hasta ahora muestra mayor relevancia como mediador del SHO. El VEGF es una citoquina angiogénica que estimula el crecimiento del endotelio y ejerce un papel importante en el desarrollo y maduración folicular, en la función del cuerpo lúteo y en la angiogénesis ovárica [28]. El receptor del VEGF incrementa la permeabilidad capilar y favorece la salida de líquido rico en proteínas al tercer espacio. También induce la proliferación de las células endoteliales y la angiogénesis *in vivo*.

Levin *et al* [29] observaron que los niveles de VEGF en líquido folicular se correlacionaban con el número de ovocitos recuperados en cada paciente. Además, este



líquido folicular estimulaba la permeabilidad vascular que podía ser inhibida con anticuerpos anti-VEGF. Estos autores proponen que el VEGF es el factor responsable del incremento de la permeabilidad en el SHO. También se ha demostrado que el VEGF aumenta su secreción tras el estímulo de la hCG, sugiriendo el papel que ejerce la hCG / LH sobre las células de la granulosa luteinizadas en la síntesis y secreción de VEGF [30]. Las diferencias interindividuales observadas en la expresión de VEGF por las células de la granulosa, puede explicar por qué no todas las pacientes sometidas a estimulación ovárica desarrollan el SHO.

Balasch *et al* [31] demostraron en pacientes sometidas a FIV por causa masculina, una mayor concentración de VEGF y adrenomedulina en el líquido folicular, obtenido el día de la punción, que en el plasma recogido ese mismo día. Además, comprobaron que tanto los macrófagos foliculares como las células de la granulosa luteinizadas eran capaces de secretar activamente tanto VEGF como adrenomedulina hasta 48 horas después de la punción.

Todas aquellas sustancias vasoactivas responsables de SHO temprano deben secretarse en respuesta a la hCG y su concentración incrementarse al menos 36 horas después de la administración de la hCG. Pellicer *et al* [13] estudiaron la concentración de VEGF en suero y líquido folicular de pacientes sometidas a estimulación ovárica y observaron que los niveles séricos estaban aumentados en pacientes que desarrollaron SHO. Sin embargo, en el líquido folicular las concentraciones de VEGF disminuyeron, lo que sugiere que el ovario quizás no es el único responsable en el inicio del síndrome de hiperestimulación.

Gómez *et al* [32] emplearon un modelo *in vivo* con ratas y demostraron que el VEGF es producido, expresado y secretado en el ovario y está implicado en el aumento de la permeabilidad vascular, en respuesta a la administración de hCG. Los animales ovariectomizados tratados con gonadotropinas y hCG no mostraron cambios en la permeabilidad vascular, demostrando el papel crucial del ovario en el desarrollo del SHO. Tras la unión de un inhibidor sintético (SU5416) al receptor-2 del VEGF se observó la remisión de los síntomas vasculares desencadenados por la hCG. Esto puede plantear nuevas estrategias para la prevención y tratamiento de este síndrome. Estos mismos autores demostraron posteriormente, con el mismo modelo animal *in vivo*, que los tratamientos de estimulación ovárica aumentan la expresión del ARNm del VEGF y



del receptor-2 del VEGF. Este incremento se observó en las células de la granulosa luteinizadas y en el endotelio del cuerpo lúteo y podrían explicar el aumento de la permeabilidad vascular y la acumulación de líquido ascítico observadas en las pacientes con SHO [33].

El VEGF ejerce su acción a través de la modificación del citoesqueleto, alterando el contorno celular y las uniones intercelulares. El empleo de anticuerpos específicos previene los cambios inducidos por la hCG y las modificaciones producidas en los filamentos de actina observados mediante microscopía confocal.

Las observaciones clínicas muestran que no todas las pacientes con alta respuesta desarrollan el SHO y los valores séricos absolutos de VEGF no tienen valor predictivo como marcador de desarrollo de SHO en pacientes con riesgo. Verheul *et al* [34] observaron que la concentración de VEGF en suero es entre 5 a 8 veces mayor que la concentración en plasma. La activación de las plaquetas incrementa los niveles de VEGF en suero hasta 10 veces. Estos resultados demuestran que el VEGF es liberado por las plaquetas durante la preparación del suero y los niveles de VEGF deberían ser medidos en plasma y no en suero.

Esta variabilidad interindividual también puede deberse a la unión del VEGF con su receptor soluble (sVEGFR-1) o con la  $\alpha_2$  macroglobulina. Estas dos moléculas actúan biológicamente como inhibidores naturales de las acciones del VEGF, al obligar que mucho ligando activo se una a ellas y no a los receptores celulares. El sVEGFR-1 tiene una gran afinidad por el VEGF, de manera que no se detectan moléculas de VEGF activas en sangre ni en líquido folicular [35, 36].

## 2.6. INTERLEUQUINAS (IL)

La IL-6 se encuentra elevada en las pacientes que desarrollan SHO y su secreción depende del estímulo de la hCG / LH. Esta elevación no depende de los macrófagos peritoneales, pero sí de los macrófagos foliculares [37].

Los experimentos *in vitro*, sobre células endoteliales, demuestran como la hCG estimula una respuesta rápida del VEGF (3 horas), mientras que la IL-6 precisa un estímulo mas largo (48 horas), como publicaron Albert *et al* [16].



Pellicer *et al* [15] estudiaron los cambios en la concentración de IL-6 antes y después de la administración de hCG y no encontraron diferencias significativas. Sí se observó que los niveles de IL-6 eran más altos en aquellas pacientes con factores de riesgo para desarrollar SHO. Aunque la concentración sérica de IL-6 puede servir de marcador para el SHO, no resulta útil en la clínica, ya que la IL-6 se eleva después de administrar la hCG. Por tanto, se ha sugerido que el VEGF puede ser un mediador de la hCG en el árbol vascular, provocando una respuesta sistémica rápida y posteriormente la IL-6 perpetúa el círculo, que así se mantiene en el tiempo.

Se ha demostrado que las células de la granulosa de un subgrupo de pacientes producen concentraciones elevadas de IL-2 en respuesta a la hCG [38]. Esto viene apoyado por las siguientes evidencias:

- El líquido folicular presenta concentraciones elevadas de IL-2 en el momento de la punción folicular.
- La hCG estimula la producción de IL-2 en las células de la granulosa y ese estímulo es dosis-respuesta dependiente.
- La IL-2 es capaz de aumentar la permeabilidad vascular.

La IL-8 es un factor activador de los granulocitos y las células T y ha sido estudiada en el líquido ascítico y suero de pacientes con SHO. La IL-8 interviene durante la respuesta aguda, favoreciendo la migración transendotelial de los neutrófilos a la cavidad peritoneal [39].

Se ha demostrado una correlación negativa entre la concentración de IL-10 y el número de folículos presentes en el momento de la punción folicular. Estos niveles disminuidos de IL-10 al principio de la estimulación pueden explicar la respuesta inmune de las células T helper tipo-1 y los fenómenos inflamatorios secundarios en el SHO [40].

Barak *et al* [41] y Gutman *et al* [42] comprobaron recientemente que las pacientes con SHO presentan concentraciones significativamente más elevadas de IL-18 en suero, en líquido peritoneal y en el derrame pleural. Esta elevación se produce tras la administración de hCG, por tanto no sería útil como marcador predictivo de SHO.



## 2.7. ANGIOGENINA

Este polipéptido es un potente inductor de neovascularización, jugando un importante papel en la neovascularización del feto y en el proceso de cicatrización. La determinación sérica en las pacientes que desarrollan SHO se incrementa 40 veces respecto a las pacientes que no lo desarrollan, y en líquido ascítico aumenta 10 veces en las pacientes hiperestimuladas [43]. Es posible que la angiogenina también sea responsable del incremento en la permeabilidad vascular.

## 2.8. ENDOTELINA-1

El péptido derivado del endotelio, conocido como endotelina-1, es un potente vasoconstrictor que incrementa la permeabilidad vascular. En pacientes sometidas a estimulación ovárica controlada, los niveles de endotelina-1 en líquido folicular son entre 100 a 300 veces superiores a los niveles detectados en plasma [44].

Las concentraciones de endotelina-1 se elevan en paralelo con otros factores vasoactivos, como la norepinefrina, la hormona antidiurética, el péptido atrial natriurético, y el sistema renina-angiotensina. Todos ellos representan la respuesta sistémica capaz de mantener la presión sanguínea en estas pacientes [23].

## 2.9. INSULINA

Las pacientes con SOP e hiperinsulinémicas desarrollan con frecuencia SHO [45]. Esto pudiera estar causado por el efecto que produce la insulina sobre la actividad aromatasas de las células de la granulosa. Recientemente, se ha investigado si las pacientes que desarrollan un SHO tienen mayor prevalencia de hiperinsulinismo, no demostrando este hecho, por lo cual se cuestiona el papel aislado de la insulina en el desarrollo del SHO [46, 47].

## 2.10. SISTEMA KININA-KALICREINA OVÁRICO

El bloqueo de este sistema con diferentes inhibidores y antagonistas reduce la permeabilidad capilar en ratas [48]. El tratamiento con mifepristona reduce la



concentración ovárica de kinina tras la administración de hCG. Este sistema juega un papel importante en el aumento de la permeabilidad capilar mediado por progesterona en ratas.

## 2.11. FACTOR VON WILLEBRAND

La hipercoagulabilidad y los fenómenos tromboembólicos son complicaciones graves del SHO y se recomienda la profilaxis con heparina de bajo peso molecular en estos casos [49]. Fabregues *et al* [50] no recomiendan la investigación de marcadores de trombofilia previa a un ciclo de TRA ya que han demostrado que esta recomendación no es coste-beneficio efectiva. Ogawa *et al* [51] han observado concentraciones séricas elevadas del factor von Willebrand en pacientes que han desarrollado SHO grave pero no en los casos moderados. Esto podría permitir planear un tratamiento profiláctico de este síndrome.

## 2.12. MOLÉCULAS DE ADHERENCIA ENDOTELIAL

Se han estudiado tres moléculas de adherencia endotelial: la selectina-E, la molécula de adhesión celular vascular-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*, VCAM-1) y la molécula de adhesión intercelular-1 (*intercellular adhesion molecule-1*, ICAM-1). Las tres se encuentran elevadas en el suero y líquido ascítico de pacientes con SHO grave. Los niveles de la fracción soluble de la selectina-E y de la ICAM-1 se correlacionan con la clínica y los aspectos biológicos del SHO. La migración transendotelial de los leucocitos y el daño tisular causado por el aumento de la permeabilidad capilar pueden estar relacionados con la alteración de estas moléculas de adhesión celular [52, 53].

## 2.13. LEPTINA

La leptina es una proteína de 16 kDa secretada por el tejido adiposo blanco y su concentración sérica refleja el estado de nutrición y las reservas energéticas. Ayustawati *et al* [54] observaron que las pacientes que desarrollaban SHO y conseguían gestación presentaron concentraciones séricas de leptina significativamente menores que aquellas pacientes sometidas a FIV que no gestaron y no se hiperestimularon. Se desconoce el



significado de estos resultados y probablemente la disminución se deba al paso de la leptina al tercer espacio.

### 3. CAMBIOS HEMODINÁMICOS

Durante el SHO se observa hipovolemia y hemoconcentración secundarias a la vasodilatación arterial periférica y al aumento de la permeabilidad capilar [207].

Solo el 2% de las pacientes sometidas a ciclos de estimulación ovárica desarrolla SHO [1], y los cambios circulatorios más acentuados sólo producen síntomas en pacientes con graves alteraciones en la circulación, pacientes previamente predispuestas o aquellas con peores condiciones basales previas al tratamiento de estimulación. Manau *et al* [55] observaron que la estimulación máxima del sistema renina-angiotensina-aldosterona y del sistema nervioso simpático se produce siete días después de la administración de hCG y permanecen elevados hasta once días después de la inducción de la ovulación. Estos cambios circulatorios son característicos del proceso de luteinización y aparecen durante la fase lútea incluso en pacientes asintomáticas sometidas a ciclos de estimulación ovárica [56].

Los factores responsables del aumento de la permeabilidad son desconocidos. Muchas sustancias han sido propuestas como mediadores, principalmente el VEGF y las IL, como acabamos de ver. Su papel en la patogénesis del SHO no está del todo claro, pero la hipovolemia secundaria a la ascitis y al derrame pleural disminuye la perfusión renal produciendo oliguria. En los casos más extremos, la presión oncótica disminuye, se produce acumulación de proteínas en el tercer espacio, shock hipovolémico, fallo renal y síndrome de distrés respiratorio.

La hemoconcentración producida por el paso de líquidos al tercer espacio incrementa la viscosidad sanguínea y se observa un aumento en el recuento de proteínas y plaquetas secundarios al estrés generalizado y al aumento de las citoquinas tras el estímulo de la hCG. Estos dos factores favorecen los fenómenos tromboembólicos. Balasch *et al* [57] investigaron la actividad procoagulante de los monocitos, ya que demostraron que la concentración plasmática de su factor tisular de expresión, que favorece la coagulación, está incrementada en las pacientes SHO grave.





La vasodilatación arterial periférica aumenta el espacio intravascular y favorece la hipotensión. Esta hipotensión pone en marcha una serie de mecanismos de compensación aumentando la secreción de hormona antidiurética y favoreciendo el sistema renina-angiotensina-aldosterona que secundariamente retiene agua y sodio. También aumenta la secreción de norepinefrina que favorece la vasoconstricción en las arteriolas periféricas. Balasch *et al* [23] postularon que la vasodilatación arterial no es la consecuencia del síndrome sino la causa. Esta disfunción circulatoria activa las sustancias vasoconstrictoras, produciendo la retención de agua y sodio. Cuando todos estos sistemas continuamente activados no compensan la hipotensión y la vasodilatación, se favorece el paso de fluidos hacia la cavidad abdominal y pleural.

La mejor manera de detener esta vasodilatación consiste en impedir la retención de sodio, mediante fármacos natriuréticos como la furosemida.

Las medidas terapéuticas que se emplean para estas pacientes deben incluir los siguientes pasos:

- Correcta expansión del volumen plasmático que permita garantizar un volumen arterial efectivo.
- El hidrotórax y la ascitis que comprometan la función pulmonar deben ser aspirados.
- Emplear albúmina que nos permite corregir el déficit de proteínas en el compartimento intravascular. Las proteínas tienen una vida media más larga que otros expansores de volumen.
- Corregir el balance electrolítico.
- Evaluar el riesgo de fenómenos tromboembólicos y de fallo renal, valorando la profilaxis con heparina de bajo peso molecular.

#### 4. ORIGEN DE LA ASCITIS

El origen de la ascitis en el síndrome de hiperestimulación no es del todo conocido. Se desconoce si el origen es ovárico, peritoneal o sistémico. En mujeres con ciclos regulares, el volumen de líquido peritoneal se correlaciona con la actividad ovárica,



siendo muy escaso en mujeres posmenopáusicas, usuarias de anticoncepción hormonal y en varones. Schenker *et al* [58] demostraron mediante el empleo de un colorante, que el incremento en la permeabilidad capilar a nivel de los ovarios es el responsable de la ascitis. Otros autores apoyaron esta hipótesis, dado el alto contenido en hormonas como estradiol, progesterona y testosterona que se pueden determinar en el líquido ascítico en comparación con el suero de esas pacientes [59]. Sin embargo, Yarali *et al* [60] extraperitonealizaron los ovarios de conejos en una localización subcutánea y no observaron disminución en el volumen del líquido ascítico tras inducir el desarrollo de un síndrome de hiperestimulación. Este estudio sugiere un origen peritoneal y no ovárico, indicando que el paso a través de la serosa extraovárica es el principal responsable de la ascitis.

Pellicer *et al* [13] demostraron que la ascitis es una respuesta del sistema vascular a un mediador. El mediador de la hCG en el endotelio vascular puede ser el VEGF, ya que sus niveles en plasma se elevan rápidamente tras la administración de hCG, en pacientes con riesgo de desarrollar un SHO. Esta rápida respuesta sistémica después se perpetúa por el incremento de otras moléculas como la IL-6 y diversos esteroides gonadales tras el estímulo crónico de la hCG o incluso del VEGF.

Balasch *et al* [23] apoyan mas el origen de la ascitis en las alteraciones hemodinámicas que se producen en el SHO. La vasodilatación periférica produce una disfunción circulatoria que activa los sistemas endógenos de vasoconstricción y retención de agua y sodio. Por tanto, la retención de agua y sodio son la causa de la ascitis y no la consecuencia de ésta.

## 5. MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y CLASIFICACIÓN DEL SHO

La aparición de la sintomatología clínica puede observarse desde el final de la estimulación ovárica por la alta respuesta ovárica con aumento del volumen de los ovarios (incomodidad para hacer vida normal, dificultad para dormir). Pasadas 48 horas después de la administración de hCG pueden aparecer los primeros síntomas, entre ellos náuseas, vómitos y dolor abdominal que progresan de forma rápida en los primeros días tras la aspiración folicular, llegando a su mayor gravedad a los 7-10 días. Este es el tiempo necesario para que la acumulación de ascitis cause una importante distensión



abdominal y oliguria, con aumento de peso y del perímetro abdominal. Puede aparecer derrame pleural, que secundariamente produce disnea, por la movilización dolorosa del diafragma. Si hay embarazo, la sintomatología se agrava por la hCG secretada por el sincitiotrofoblasto. Es poco frecuente encontrar síndromes graves sin que exista gestación, pero pueden presentarse, en cuyo caso, su duración es menor.

Se han propuesto diferentes clasificaciones desde que Rabau publicó la suya en 1967, seguida por las de Schenker y Weinstein en 1978 [61], Golan *et al* en 1989 [62], Navot *et al* 1992 [1] y la de Rizak y Aboulghar en 1999. La más utilizada es la de Golan *et al* [62] que incorpora síntomas, signos, hallazgos de laboratorio y ecográficos (tabla I). La clasificación original [61] ha sufrido varias modificaciones [1] y actualmente el SHO se clasifica en cuatro estados según el nivel de gravedad: leve, moderado, grave y el último estado, crítico, que amenaza la vida de la paciente.

**Tabla I.** Estadios del síndrome de hiperestimulación ovárica.

Leve	Estradiol sérico elevado Ovarios menores de 5 cm
Moderado	Distensión abdominal Náuseas, vómitos o diarrea Tamaño ovárico entre 5-12 cm
Grave	Ascitis (hidrotórax / derrame pericárdico) Disfunción renal Oliguria < 600 mL/24 horas Niveles de creatinina 1.0-1.5 mg/dL Aclaramiento de creatinina > 50 mL/min Hematocrito > 45% Leucocitosis > 15000
Crítico	Ascitis a tensión con hidrotórax y derrame pericárdico Hematocrito > 55% Leucocitosis > 25000 Disfunción renal grave Oligoanuria < 100 mL/24 horas Niveles de creatinina > 1.6 mg/dL Aclaramiento de creatinina < 50 mL/min Distrés respiratorio del adulto Fenómenos tromboembólicos

El **SHO leve** se caracteriza por niveles de estradiol y progesterona elevados y ovarios ligeramente aumentados de tamaño (< 5 cm).



El **SHO moderado**, además de los cambios hormonales ya descritos, la paciente presenta distensión y dolor abdominal, náuseas y/o vómitos, y/o diarrea, con un diámetro ovárico entre 5 y 12 cm.

El **SHO grave** se caracteriza por un diámetro ovárico mayor de 12 cm, ascitis, hidrotórax [63] e incluso derrame pericárdico. Se observa ganancia de peso e inestabilidad hemodinámica, caracterizada por hipotensión ortostática y taquicardia además de dificultad respiratoria y taquipnea. La función renal también se afecta, observando  $< 600$  ml de orina / 24 horas, niveles plasmáticos de creatinina entre 1.0-1.5 mg/dL, y aclaramiento de creatinina  $\geq 50$  ml/min. Se observa hemoconcentración con hematocrito  $> 45\%$  y leucocitosis  $> 15000$ . El hematocrito es el parámetro que mejor se correlaciona con las concentraciones plasmáticas de sustancias vasoactivas como la aldosterona, la norepinefrina, la hormona antidiurética y la actividad plasmática de la renina, como demostraron Fabregues *et al* [64].

En el **SHO crítico**, que amenaza la vida de la paciente, se observa un abdomen a tensión, hidrotórax y derrame pleural, hemoconcentración severa con hematocrito  $> 55\%$ , leucocitosis  $> 25000$  y fallo renal con oligoanuria, creatinina plasmática  $\geq 1.6$  mg/dL y aclaramiento de creatinina  $< 50$  mL/min. En estos casos se ha descrito la aparición del síndrome de distrés respiratorio del adulto y fenómenos tromboembólicos.

Las formas leves y moderadas pueden ser tratadas mediante tratamiento ambulatorio, pero las formas severas y críticas deben ingresar en una unidad de cuidados intensivos dada la gravedad de estas pacientes.

Abramov *et al* [65] recogieron las manifestaciones clínicas de 209 pacientes que fueron diagnosticadas de un SHO grave, en un estudio multicéntrico durante 10 años. Las pacientes presentaron disnea (92%), dolor abdominal relacionado con la ascitis (99%), molestias gastrointestinales (54%), disminución en la producción de orina (30%), edemas (13%), irritación peritoneal (6%), disminución en la ventilación pulmonar y atelectasias (4%), síndrome de distrés respiratorio del adulto como consecuencia de una hidratación masiva (2%), embolismo pulmonar (2%) y fallo renal agudo (1%).



Se debe tener en cuenta que el tamaño de los ovarios no siempre permite una correcta clasificación del grado de afectación de la paciente, debido a la aspiración del líquido folicular y a la hemorragia secundaria que se produce. La clasificación se debe basar en la sintomatología de la paciente y en los datos de laboratorio obtenidos [1].

El tromboembolismo es la manifestación más peligrosa del SHO [66]. El riesgo está aumentado por la hemoconcentración [67], la disminución del flujo periférico y la inactividad secundaria a la distensión abdominal y al dolor. En la mayoría de los casos su origen es venoso (75%) (venas profundas, vena yugular interna, vena subclavia, vena cava inferior), en el resto son trombosis arteriales (25%) (arteria cerebral media, arteria cerebral anterior, arteria carótida interna, arteria vertebral, arteria humeral, arteria femoral, arteria mesentérica, aorta o arteria subclavia). Fabregues *et al* [50] demostraron recientemente que la prevalencia de marcadores de trombofilia no está aumentada en las pacientes que desarrollan SHO grave. Por tanto, a pesar de que los fenómenos trombóticos constituyen una complicación grave de este síndrome, no se ha demostrado que sea coste efectivo la investigación de la resistencia a la proteína C activada (y posteriormente estudiar la mutación del factor V de Leiden) ni de la mutación del gen G20210A de la protrombina en toda la población que se somete a un ciclo de FIV [68].

Las alteraciones hepáticas no son infrecuentes y se detectan en un 1/3 de las pacientes con SHO grave [69]. Se observa elevación de las enzimas hepáticas y en algunos casos se acompaña de aumento de la gamma-glutamyl transpeptidasa y la fosfatasa alcalina. Todas estas alteraciones revierten una vez que el síndrome desaparece. Se desconoce cual es el mecanismo fisiopatológico que altera la función hepática. El incremento de estradiol secundario al tratamiento con gonadotropinas puede alterar la función hepática [10], al igual que ocurre en las mujeres usuarias de anticoncepción hormonal.

## 5.1. PRESENTACIONES INFRECIENTES DEL SHO

El SHO no es solo desencadenado por la administración exógena de gonadotropinas, sino también por la estimulación endógena. Es el caso de algunas gestantes con SOP [2], gestantes con niveles séricos elevados de hCG, como en la enfermedad trofoblástica [3, 4], pacientes con hipotiroidismo primario [5] o pacientes con adenomas



gonadotropos secretores de LH y FSH [7, 8, 9]. Incluso el efecto *flare-up* provocado por los agonistas de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), puede provocar un SHO en pacientes con SOP.

En algunas pacientes se ha descrito el derrame pleural como única manifestación clínica del SHO. Suelen ser pacientes con presión abdominal positiva, presión intratorácica negativa y defectos diafragmáticos que permiten el paso de sustancias vasoactivas y líquido ascítico hacia el espacio pleural.

## 6. REDUCCIÓN DE LA IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA

Se ha demostrado que los tratamientos de estimulación ovárica empleados en los ciclos de fecundación *in vitro* deterioran la receptividad uterina cuando los comparamos con los ciclos naturales [73]. Los niveles suprafisiológicos de hormonas esteroideas inducen alteraciones morfológicas y bioquímicas en la receptividad uterina. Las pacientes con alta respuesta, y que en algunos casos desarrollan SHO, presentan tasas de implantación más bajas [74, 75, 76, 77, 78, 79]. Se puede mejorar la receptividad uterina con protocolos de estimulación más suaves, que permitan obtener una respuesta ovárica con niveles de estradiol más bajos [80].

En estas pacientes se produce un efecto deletéreo sobre la calidad ovocitaria. Se ha observado menor grado de madurez y calidad ovocitaria en pacientes con alta respuesta y niveles séricos de estradiol elevados [77]. La tasa de fecundación también es más baja en pacientes obesas diagnosticadas de SOP y de resistencia a la insulina, que además presentan cierta predisposición al SHO por su alta respuesta a los tratamientos de estimulación ovárica [81]. Al contrario de estos datos, Fabregues *et al* [82] no encontraron diferencias en la calidad ovocitaria, en las tasas de implantación y gestación en pacientes que desarrollaron SHO grave cuando se compararon con ciclos de estas mismas pacientes en los cuales no desarrollaron el síndrome. Estos resultados se comprobaron tanto en pacientes con y sin SOP.



## 7. FACTORES DE RIESGO PARA EL SHO

El punto fundamental para reducir la incidencia del SHO es la identificación de las pacientes en riesgo. Se emplean criterios epidemiológicos, hormonales, ecográficos y bioquímicos para seleccionar a este grupo de pacientes.

### 7.1. Historia de SHO en una estimulación previa

Aquellas pacientes con este antecedente están en riesgo de desarrollarlo en una nueva estimulación ovárica, por lo que debemos ser extremadamente cuidadosos eligiendo las dosis mínimas posibles de gonadotropinas.

### 7.2. Edad

La mayoría de los estudios coinciden que las pacientes jóvenes tienen mayor predisposición [83]. Probablemente se debe a que los ovarios en estos casos tienen mayor densidad de receptores para las gonadotropinas y un número mayor de folículos que responderán a este estímulo. Pero debemos tener claro que en las pacientes jóvenes que no responden a los tratamientos de estimulación (FSH elevada, mala respuesta en un ciclo previo), es menos probable que se desarrolle el SHO.

### 7.3. Índice de masa corporal (IMC)

En la práctica existe una clara relación entre la aparición de SHO e IMC bajo. Se piensa, en este sentido, que cuanto menor sea el IMC, mayor es la facilidad para desarrollar el SHO (pacientes pequeñas, delgadas).

### 7.4. Concentración sérica de estradiol

Se emplean para monitorizar la respuesta de la paciente a la estimulación ovárica. Inicialmente Crooke en 1970 [84] estableció una correlación entre los niveles preovulatorios de estradiol en orina y la incidencia de SHO severo. Asch *et al* [85] intentaron identificar el grupo de riesgo entre 637 pacientes de fecundación *in vitro*, de las cuales el 0.94% habían presentado SHO. Encontraron que por debajo de 3500 pg/mL de estradiol en sangre ninguna de las pacientes desarrolló SHO, con una sensibilidad del 83% y una especificidad del 99%, pero el valor predictivo fue tan



sólo del 38%. Marthur *et al* [86] calcularon la sensibilidad y la especificidad de la prueba, para diferentes valores de corte, y se obtuvo una OR de 6.37 para un nivel de estradiol  $> 2642$  pg/mL, y de 0.13 para un valor  $< 1847$  pg/mL. Aunque los niveles de estradiol son significativamente mayores en las pacientes que desarrollan SHO comparadas con los controles, la determinación de estradiol por sí sola no es suficiente para predecir la aparición del SHO, por lo que debe asociarse a los hallazgos ecográficos. Se han descrito casos en la literatura de SHO grave en pacientes con concentraciones séricas de estradiol bajas [87]. A efectos prácticos, un estradiol sérico superior a 2500-3000 pg/mL debe ponernos en alerta e iniciar las estrategias de prevención, como si la paciente fuera a hiperestimularse.

### 7.5. Síndrome de ovarios poliquísticos

El grupo de pacientes con SOP que presentan obesidad, hiperandrogenismo y niveles elevados de LH también deben ser vigiladas por el riesgo aumentado de hiperestimulación [88]. Estas pacientes suelen producir un número mayor de folículos, mostrando una respuesta exagerada a la estimulación ovárica. Kamat *et al* [89] describieron niveles elevados de ARNm para el VEGF en pacientes con SOP. Agrawal *et al* [90] describieron concentraciones séricas y en líquido folicular de VEGF aumentadas en pacientes con ovario poliquístico comparadas con un grupo control. Posteriormente, en un trabajo prospectivo en el que incubaron células de la granulosa, comprobaron que la concentración de VEGF liberado por las células de la granulosa es dependiente de las gonadotropinas y aumentada por el estímulo de la insulina en presencia de hCG [91]. Por tanto, las pacientes con SOP y resistencia a la insulina secretarán niveles más altos de VEGF y por tanto tendrán más riesgo de desarrollar el SHO.

### 7.6. Número y tamaño de los folículos durante la estimulación

Las pacientes con SHO tienen un número significativamente mayor de folículos en el momento de la administración de la hCG y el riesgo de desarrollar un SHO está de acuerdo con el número de folículos en crecimiento y el número de ovocitos aspirados. Ash *et al* [85] observaron que entre las pacientes estudiadas, ninguna de las que obtuvo 20 ovocitos o menos en la punción se hiperestimuló, mientras que el 22% de las que obtuvieron 30 ó más lo hicieron. Estos autores describieron que la aspiración de 30 ó más ovocitos se asoció con una sensibilidad del 83%,



especificidad del 67% y un valor predictivo positivo del 23% de desarrollar el SHO. No podemos pasar por alto la existencia de folículos inmaduros, pequeños, que aunque no van a aportar ovocitos maduros al ciclo, las células de la granulosa sí secretan estradiol y mediadores vasculares al torrente circulatorio. Los hallazgos ecográficos y los niveles de estradiol deben considerarse en conjunto para tratar de predecir con mayor fiabilidad el riesgo de desarrollar este síndrome.

### 7.7. Inmunoactivación

Un estudio epidemiológico muestra que aquellas pacientes que han desarrollado un SHO presentan mayor incidencia de alergia (56% vs 21%), indicando que posiblemente intervengan también determinados mecanismos inmunológicos en el desarrollo de este síndrome [83].

### 7.8. VEGF

Cada vez es mayor la evidencia científica respecto al papel de determinadas sustancias vasoactivas en el desarrollo del SHO, y el empleo de dichas sustancias como marcadores precoces. Parece que uno de los más importantes es el VEGF, relacionado directamente con el aumento de la permeabilidad vascular.

Artini *et al* [93] evaluaron la concentración de VEGF en plasma y líquido folicular de mujeres sometidas a tratamientos de estimulación ovárica controlada y llegaron a la conclusión de que los niveles plasmáticos de VEGF el día de la punción folicular pueden ser considerados como un marcador para predecir el riesgo de desarrollar un SHO en dichas pacientes. Otros autores consideran que el mejor marcador es el incremento en la concentración de VEGF desde el momento de la administración de hCG hasta el día de la punción folicular, con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 60% [90]. Pellicer *et al* [13] encontraron que sólo tiene valor pronóstico la concentración de VEGF en líquido folicular, con escaso valor en la clínica diaria pero que apoya el papel del VEGF como mediador de las alteraciones vasculares que presentan las pacientes que desarrollan un SHO. Se ha observado una gran dispersión en los valores de VEGF publicados por los diferentes grupos y esto, unido a la gran variedad de pacientes, hace por ahora imposible aceptar la determinación de VEGF como un marcador predictivo para mujeres en riesgo de desarrollar un SHO.



### 7.9. Polimorfismo en el receptor de la FSH

Daelemans *et al* [94] han publicado que aquellas pacientes que desarrollan síntomas más graves de hiperestimulación ovárica, presentan un polimorfismo en su receptor de FSH. La investigación del cambio de un aminoácido en la posición 680 del receptor de la FSH no predice el desarrollo del SHO pero sí alerta sobre la gravedad de los síntomas que presentan las pacientes con este polimorfismo.

Combinando los factores descritos hasta ahora, Agrawal *et al* [90] concluyeron que el mejor valor predictivo positivo se obtenía tras la combinación del incremento en la concentración de VEGF, el número de folículos medidos por ecografía, la apariencia ecográfica de ovarios poliquísticos y la concentración sérica de estradiol. Todos estos factores por separado presentan un valor predictivo positivo más bajo que si se emplean combinados.

## 8. PREVENCIÓN

Se han propuesto diversas estrategias para prevenir la aparición del SHO [49], de todas ellas la más importante es la correcta identificación de las pacientes en riesgo. Como esto último no siempre es posible, se ha intentado poner en marcha una serie de actuaciones que impidan el desarrollo completo del síndrome una vez que ya hemos iniciado la estimulación.

**8.1. Cancelación del ciclo.** Suspender definitivamente la inyección de la hCG y cancelar el ciclo es la única estrategia 100% segura para evitar eficazmente los casos de SHO. Pero es difícil de aplicar en la práctica clínica debido a la pérdida de un ciclo en el que la pareja ha invertido su tiempo, dinero y expectativas. Mantener el agonista de la GnRH hasta que la paciente inicia la menstruación puede favorecer la involución de los cuerpos lúteos y mejorar la sintomatología [95]. Debe advertirse a la pareja que eviten las relaciones sexuales, ya que puede ocurrir una ovulación espontánea hasta 11 días después de la interrupción del tratamiento con gonadotropinas, pudiendo producirse un embarazo espontáneo y por tanto un SHO tardío y/o un embarazo múltiple.



**8.2. Aplazar la aplicación de hCG.** Existe suficiente evidencia científica para afirmar que la hCG es la hormona que desencadena el síndrome de hiperestimulación, probablemente basado en el desconocimiento de otras moléculas que seguro intervienen en este proceso. Posponer la aplicación de la hCG hasta que el tamaño de los ovarios disminuya es una alternativa segura.

**8.3. Disminución de la dosis de hCG en la inducción de la ovulación.** La frecuencia de SHO es baja en las pacientes que reciben entre 1000 y 5000 Unidades Internacionales (UI) de hCG, en comparación con las que reciben de 5000 a 15000 UI. Abdala *et al* [96] compararon diferentes dosis de hCG, administrando dosis únicas de 2000, 5000 y 10000 UI de hCG para desencadenar la ovulación. Estos autores encontraron un número significativamente menor de ovocitos recuperados con la dosis de 2000 UI por lo que sugieren administrar 5000 UI de hCG siempre que tengamos una paciente con riesgo de desarrollar el SHO (estradiol elevado, IMC bajo, alta respuesta).

**8.4. Soporte de la fase lútea con progesterona.** El empleo de progesterona exógena en lugar de hCG, como soporte de la fase lútea, fue una de las primeras medidas que consiguió disminuir la frecuencia del SHO [97, 12]. La progesterona se puede administrar resuspendida en aceite por vía IM, o bien como progesterona natural micronizada en forma de comprimidos vaginales (400 mg/día) o gel vaginal al 8%.

**8.5. *Coasting o drifting*.** Es una alternativa eficaz que, aunque reduce su frecuencia, no evita el 100% de los casos de SHO. El *coasting* consiste en postergar la administración de la hCG, realizando controles diarios de la concentración sérica de estradiol hasta comprobar que éste desciende a un nivel considerado seguro (<3500 pg/mL). Entonces se administra la hCG y se programa la punción folicular 36 horas después, como en un ciclo convencional [98]. No afecta a la calidad embrionaria ni ovocitaria y cuando su duración es menor de 4 días no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en cuanto a las tasas de embarazo e implantación [99, 100, 101]. Moreno *et al* [102] demostraron recientemente que la luteinización prematura adelanta la ventana de



implantación, y esto podría explicar la menor tasa de implantación y gestación observada en los ciclos de estimulación en los cuales el *coasting* se prolonga mas de 4 días.

En una encuesta realizada por Delvigne y Rozenberg [103] entre ginecólogos especializados en reproducción, el *coasting* parece ser el método más escogido para la prevención del SHO, debido a que presenta algunas ventajas como que el ciclo no es cancelado, la técnica permite la transferencia de embriones frescos evitando su criopreservación y no necesita la instauración de una terapia adicional o uso de medicamentos. Parece que el mecanismo por el cual el *coasting* es eficaz en la disminución de la frecuencia del SHO reside en que los folículos de menor tamaño precisan una mayor concentración de gonadotropinas para mantener su desarrollo y por tanto entran en un proceso de apoptosis al suspender su administración. En cambio, los folículos mayores, que precisan una menor concentración de gonadotropinas al final de la estimulación ovárica, continúan su desarrollo. Esta muerte por apoptosis de los folículos pequeños e intermedios consigue reducir el número de células de la granulosa viables, que una vez luteinizadas producirían las sustancias vasoactivas responsables del desarrollo del SHO.

Recientemente, Tozer *et al* [104] y García-Velasco *et al* [105] en dos estudios de casos y controles, comparando a pacientes sometidas a *coasting* con un grupo control, han demostrado una clara disminución en la concentración de VEGF en los líquidos foliculares de pacientes sometidas a *coasting*, cuando se compararon de acuerdo a los diámetros foliculares.

En la literatura disponible no existe un consenso sobre los niveles de estradiol sérico indicados para el inicio del *coasting*, ya que se encuentran valores desde 3000 hasta 6000 pg/mL. Fluker *et al* [106] compararon dos maneras diferentes de iniciar el *coasting*:

- a) **Precoz:** Cuando el nivel plasmático de estradiol alcanzaba 1800 pg/mL, se iniciaba el *coasting* hasta que descendía un 25%, momento en el cual se



podía reiniciar el tratamiento estimulador con gonadotropinas. Se alcanzó una tasa de gestación por ciclo del 23%.

- b) **Tardío:** El *coasting* también fue evaluado en pacientes sometidas a ciclos de fecundación *in vitro* cuando el nivel plasmático de estradiol alcanzaba 4000 pg/mL y al menos tres folículos tenían un diámetro medio de 18 mm. En ese momento se suspendió el tratamiento con gonadotropinas hasta alcanzar niveles de estradiol seguros (menos de 3000 pg/mL), momento en el cual se administraba la hCG. La tasa de gestación fue del 37% [99].

Un dato interesante es que todas las pacientes pudieron ser sometidas a punción folicular por tanto no hubo que recurrir a la cancelación del ciclo. Esto hace pensar que el *coasting* puede ser una buena maniobra para reducir, aunque no eliminar, el riesgo de SHO. La vigilancia estrecha -diaria- de los niveles de estradiol es muy importante para evitar que caigan de forma brusca sus niveles. Por otro lado, si se aplica muy pronto la dosis de hCG, la paciente continuará en riesgo de desarrollar un SHO.

El *coasting* es una variante de los ciclos de estimulación ovárica *step-down*, basados en estimulaciones con dosis decrecientes de gonadotropinas, que pretenden seleccionar una cohorte de folículos maduros, impidiendo el crecimiento de folículos pequeños y por tanto inmaduros [80]. Las células de la granulosa de los folículos más pequeños son muy poco resistentes a la caída del estradiol, lo que permite rescatar ciclos hiperestimulados manteniendo buenas tasas de gestación.

**8.6. Aspiración folicular antes y después de la administración de hCG.** La aspiración folicular el día de la punción puede proteger frente al síndrome de hiperestimulación, ya que causa una hemorragia intrafolicular y aspiración de las células de la granulosa, induciendo un descenso en la producción ovárica de las posibles moléculas implicadas en el desarrollo del síndrome. Dos estudios diferentes observaron los beneficios de la aspiración folicular de un ovario antes de la administración de hCG [107, 108]. Posteriormente se induce la ovulación con hCG y se realiza la aspiración folicular del otro ovario para obtener los ovocitos maduros. Esta maniobra se basa en la reducción de los factores



intraováricos responsables del SHO y aunque los resultados iniciales fueron prometedores con el primer estudio observacional retrospectivo [108], un segundo trabajo randomizado y prospectivo demostró que la aspiración folicular de un ovario no disminuía el riesgo de hiperestimulación [107]. Aparte de para prevenir el SHO, la aspiración de folículos inmaduros puede ayudar a estas pacientes, si después se consigue la maduración *in vitro* de estos ovocitos inmaduros y la fecundación posterior [109, 110].

**8.7. Albúmina.** La administración de albúmina humana intravenosa tras la punción folicular fue propuesta hace tiempo como un tratamiento seguro, económico y efectivo para prevenir el riesgo de desarrollar un SHO grave. Su mecanismo de acción consta de dos acciones diferentes, por un lado la capacidad de fijación de sustancias vasoactivas que posee la albúmina humana, y por otro el poder oncótico que podría disminuir la pérdida de líquidos al espacio extravascular. Pero minimizar los síntomas del síndrome no es lo mismo que prevenir dicho síndrome. De hecho, la administración de albúmina sólo consigue disminuir o retrasar el proceso. Varios trabajos han intentado valorar los beneficios de este tratamiento y no se ha conseguido llegar a ningún consenso. Diversas revisiones de este tema sugieren que no hay suficiente evidencia científica del papel profiláctico de la infusión de albúmina intravenosa [111]. Bellver *et al* [112] demostraron con claridad que la infusión de 40 gr. albúmina vía iv, el día de la recuperación ovocitaria, no previene el desarrollo del SHO moderado y grave. Para ello compararon dos grupos de 488 pacientes cada uno, mediante un estudio prospectivo randomizado. Con este trabajo se demostró que la tasa de SHO moderado y grave era similar en ambos grupos, y en aquellas pacientes que desarrollaron síntomas no se encontraron diferencias significativas en los parámetros clínicos y de laboratorio estudiados. Por tanto, el empleo de albumina el día de la punción folicular no previene la aparición del SHO.

**8.8. Hidroxietileno de almidón.** Es una molécula de 200.000 kDa de peso molecular que actúa como un expansor plasmático elevando la presión oncótica, disminuyendo la viscosidad sanguínea e inhibiendo la agregación plaquetaria [113]. König *et al* [114] publicaron los resultados de un estudio prospectivo y randomizado empleando expansores del plasma demostrando una menor



incidencia de SHO moderado y severo en pacientes sometidas a ciclos de fecundación *in vitro*.

Este tratamiento ha sido propuesto para evitar el desarrollo de SHO, realizando una infusión dos horas después de la transferencia embrionaria en pacientes consideradas de riesgo. Pero se necesitan más estudios y con mayor número de pacientes que prueben su utilidad. Abramov *et al* [115] compararon la eficacia del hidroxietileno de almidón frente a la albúmina para la prevención del SHO grave y encontraron que las pacientes que recibieron hidroxietileno de almidón presentaron mayor eliminación urinaria y necesitaron menor tiempo de hospitalización que el grupo que fue tratado con albúmina.

### 8.9. Criopreservación de los embriones y transferencia en un ciclo posterior. El

SHO es más frecuente en los ciclos en los cuales las pacientes consiguen gestación, gracias a la acción de la hCG endógena proveniente del sinciotiotrofoblasto. Por tanto, se ha postulado la congelación embrionaria como una solución en la prevención del **SHO tardío**. Obviamente, el principal problema de la criopreservación es la menor tasa de gestación si se compara con las transferencias embrionarias en fresco. Diversos estudios retrospectivos [116] han demostrado una tasa de gestación aceptable para aquellos ciclos en los cuales se decidió la criopreservación de todos los embriones, en pacientes con alto riesgo de desarrollar un SHO. Los beneficios de esta actuación han sido comparados con la infusión de albúmina intravenosa [117]. No se observaron diferencias en la prevención del síndrome de hiperestimulación, pero sí una mayor tasa de gestación en aquellos ciclos que criopreservaron los embriones. Este resultado se puede explicar porque la albúmina iv no disminuye las concentraciones séricas de estradiol y se ha demostrado que los niveles altos afectan a la receptividad endometrial [80]. Los embriones descongelados se transfirieron posteriormente en un ciclo natural o sustituido con valerianato de estradiol sobre una mucosa endometrial no sometida al estímulo hormonal elevado.

### 8.10. Desencadenar la ovulación con FSH. Se administra un bolo de FSH que

sustituye al pico de LH, y por tanto evitamos los efectos de la hCG. El reinicio de la meiosis, ovulación y luteinización de las células de la granulosa no sólo se



produce por la contaminación con LH de las preparaciones purificadas, ya que la FSH recombinante por sí sola es capaz de inducir dichos cambios [118].

**8.11.LH recombinante para inducir la maduración folicular final y la ovulación.** La hCG y la LH son hormonas muy similares ya que causan y conservan la luteinización. La hCG tiene una eliminación más lenta y en dos fases. La vida media de la hCG es 2.32 días mayor que la de la LH, y su actividad biológica es mayor ya que se sabe produce más complicaciones como el SHO.

Gómez *et al* [119] demostraron recientemente los beneficios del empleo de LH para desencadenar la ovulación. Para ello, sobre un grupo de ratas hiperestimuladas emplearon suero salino, 10 UI de hCG, 10 UI de FSH, 10 UI de LH y 60 UI de LH para desencadenar la ovulación. Todas las hormonas fueron efectivas, pero el grupo de 10 UI de LH presentó menor permeabilidad vascular y expresión de VEGF en las células ováricas.

El grupo europeo para el estudio de la LH recombinante (LHr) realizó un trabajo multicéntrico doble ciego en 259 mujeres entre 18 y 39 años que fueron sometidas a protocolos de estimulación largos con agonistas de la GnRH y estimuladas con FSHr. Fueron asignadas de forma aleatoria a uno de los cuatro grupos que emplearon LHr para desencadenar el proceso de la ovulación previo a la punción-aspiración de los ovocitos usando: 5000 UI, 15000 UI, 30000 UI o un esquema de 15000 UI + 10000 UI tres días después de la primera dosis y los compararon con un grupo control que recibió 5000 UI de hCG, para además buscar la mínima dosis efectiva de LHr. No hubo diferencias estadísticamente significativas en cuanto al número de ovocitos recuperados el día de la punción, número de ovocitos recuperados por folículos observados en la ecografía, madurez nuclear, número de embriones, tasa de implantación y tasa de embarazos bioquímicos y clínicos. Observaron que la dosis mínima eficaz de LHr comparable en resultados a la acción de 5000 UI de hCG está entre 15000 – 30000 UI. Se encontró una clara relación entre el desarrollo de SHO moderado y el tipo de tratamiento recibido, siendo mayor en los grupos que recibieron 15000 UI + 10000 UI tres días después (12%) y en el grupo de la hCG (12.4%)[120].



Manau *et al* [121] estudiaron los cambios hemodinámicos originados tras la inducción de la ovulación y soporte de la fase lútea con hCG comparando con pacientes que recibieron LHr, mediante un estudio clínico prospectivo y randomizado. Los parámetros comparados fueron la tensión arterial, el gasto cardiaco, la resistencia vascular periférica, el nivel sérico de progesterona y las concentraciones plasmáticas de aldosterona, norepinefrina y renina. Se demostró que ambos grupos presentaron una respuesta ovárica similar con ambos tratamientos y los cambios circulatorios fueron menos intensos en el grupo tratado con LHr, por tanto se podría emplear la LH como tratamiento inductor de la ovulación en aquellas pacientes con antecedentes de SHO o riesgo elevado de padecerlo.

**8.12.Desencadenar la ovulación con agonistas de la GnRH.** Los agonistas de la GnRH producen la secreción endógena de FSH y LH, con una duración de la fase lútea y niveles de progesterona similares a los ciclos con hCG. Los agonistas de la GnRH pueden ser una buena alternativa para la inducción de la ovulación en pacientes con riesgo de hiperestimulación, pero no son válidos para los ciclos de estimulación ovárica que emplean precisamente los agonistas para la desensibilización hipofisaria [122, 123]. Su vida media es de 3 a 5 horas por tanto eliminan el riesgo de SHO en los ciclos sin gestación. La tasa de ovulación para ciclos de IAH fue cercana al 75%, con una tasa de gestación del 17% y escaso porcentaje de gestaciones múltiples. Ninguna mujer desarrolló SHO en las series estudiadas.

Fausser *et al* [124] y Balasch *et al* [125] demostraron que una dosis única de agonista de la GnRH (triptorelina 0.2 mg o leuprorelina 0.5 mg) es efectiva para desencadenar los estadios finales de la maduración ovocitaria. La administración de análogos de la GnRH causa un aumento inicial de los niveles de FSH y LH, producto de su conocido efecto *flare up*, con un aumento de la concentración de la LH cercana a la fisiológica. Esto podría prevenir el SHO, pues su vida media es más corta que la de la hCG.

**8.13.Octeotride.** Los análogos de la somatostatina reducen los niveles de insulina, del factor de crecimiento tipo insulina 1 ( *insulin-like growth factor 1* ó IGF-1)



y LH, por tanto se pensó que podían disminuir el riesgo de SHO en pacientes con riesgo. Se ha estudiado su efecto, en pacientes con SOP y resistentes al citrato de clomifeno, observando niveles inferiores de estradiol y un número menor de folículos cuando se compara con el placebo [126].

**8.14. Antagonistas de la GnRH.** Se han descrito receptores para la GnRH en las células de la granulosa, por tanto se puede emplear este fármaco para suprimir la función hipofisaria y también para prevenir el desarrollo del SHO [127]. La acción directa de los antagonistas de la GnRH sobre el ovario disminuye la concentración sérica de estradiol, el tamaño ovárico y se observa una frecuencia menor de desarrollo de SHO [42]. García-Velasco *et al* [128] demostraron el efecto de los antagonistas de la GnRH sobre la esteroidogénesis ovárica, observando una disminución en la producción folicular de estradiol y manteniendo concentraciones similares de progesterona y testosterona cuando se compara con los agonistas de la GnRH.

**8.15. Ketokonazol.** La administración de dosis bajas intermitentes de ketokonazol disminuye las síntesis de estrógenos ováricos y esto puede reducir la tasa de cancelación de ciclos con riesgo de hiperestimulación [129]. Posteriormente, se ha demostrado que la adición de ketokonazol en pacientes con SOP no disminuye el riesgo de SHO en los ciclos de estimulación ovárica controlada [130].

**8.16. Electrocauterización ovárica.** La electrocauterización ovárica tras la desensibilización hipofisaria ha sido propuesta para prevenir el SHO [131], pero no como primera opción para mujeres con riesgo. El mecanismo de acción no está claro, pero altera el ambiente endocrinológico del ovario a través de la disminución de los niveles locales de andrógenos, la destrucción del estroma del ovario y la rotura de la cápsula ovárica engrosada en las pacientes con SOP. Este procedimiento puede ser realizado a través de laparoscopia o fertiloscopia y está reservado solamente para pacientes que al menos tengan un ciclo de estimulación ovárica cancelado por riesgo de hiperestimulación. Esta técnica plantea dos inconvenientes: la necesidad de anestesia general y la creación de adherencias, las cuales no son disminuidas con medidas como los métodos de barrera o el empleo de la ascitis artificial.



## 9. TRATAMIENTO

En el tratamiento del SHO se recomienda la actitud conservadora, que permita preservar la fertilidad de la paciente. La extirpación de los ovarios sólo está indicada si se demuestra necrosis tisular secundaria a una torsión ovárica. La individualización de los protocolos de estimulación ovárica y un tratamiento rápido, cuando se diagnostica el SHO, permiten disminuir la incidencia y severidad de este síndrome [132].

Ante el SHO la primera decisión a tomar es si la paciente debe hospitalizarse o bien puede recibir tratamiento ambulatorio. Un gran porcentaje de las pacientes que desarrollan el SHO presentaran el grado leve, que se caracteriza por molestias abdominales sin vómitos, diarrea u otra sintomatología que nos haga pensar que sea necesaria su hospitalización. Las pacientes con síntomas más floridos (náuseas, diarrea, falta de apetito, deshidratación, oliguria) deben someterse a una estricta evaluación física, pélvica y abdominal. Son necesarios controles seriados para medir la concentración de electrolitos, el hematocrito y la creatinina y evaluar mediante ultrasonografía la presencia y el volumen de la ascitis, así como pesar a la paciente. Si la paciente presentara síntomas respiratorios se debe realizar una radiografía de tórax y control de la saturación de oxígeno mediante pulsioximetría. La hospitalización es opcional y de acuerdo al criterio médico en los grados moderado y grave, y necesaria en el grado crítico, considerado de riesgo para la vida de la paciente.

Hasta que no se conozcan perfectamente los mecanismos fisiopatológicos que intervienen en el síndrome, el tratamiento continuará siendo empírico. Sin embargo, el conocimiento parcial de algunos procesos que intervienen en la clínica ha permitido desarrollar algunos tratamientos basados en la evidencia científica.

**9.1. Reposo en cama.** Existe un razonamiento científico para recomendar el reposo estricto en cama de estas pacientes. Si la paciente permanece de pie, el sistema renina-angiotensina-aldosterona y el sistema nervioso simpático se encuentran activados, y por tanto disminuye el filtrado glomerular y la respuesta a los diuréticos de asa [133].



Se debe tener en cuenta la persistencia de quistes ováricos, que pueden presentarse hasta la edad gestacional avanzada y que pueden romperse o predisponer a una torsión anexial, con el desarrollo de abdomen agudo. Por tanto, se debe recomendar la baja laboral y el reposo en cama.

**9.2. Paracentesis evacuadora.** Si se diagnostica ascitis a tensión, ésta debe ser evacuada para mejorar la sintomatología de las pacientes [69]. El aumento de la presión intraabdominal puede comprometer el retorno venoso y el gasto cardiaco, favorecer el edema renal y los fenómenos trombóticos. Las pacientes que más se benefician de este tratamiento son aquellas que desarrollan oliguria, niveles elevados de creatinina en sangre y hemoconcentración [134]. Se ha demostrado que es una técnica fácil, segura y que permite a la paciente un alivio en la sintomatología que presenta. En algunos casos, la necesidad de varias paracentesis se puede evitar colocando un sistema cerrado mediante un catéter Dawson-Mueller, que permite el drenaje continuo de la ascitis [135, 136]. Si se existe inestabilidad hemodinámica o si se sospecha hemoperitoneo, no debemos realizar paracentesis. En estos casos es vital el control de los parámetros hemodinámicos de las pacientes, ya que la rápida movilización del líquido ascítico puede provocar la disminución del volumen efectivo intravascular y por tanto producir graves consecuencias. El *shunt* peritoneal que permite la autotransfusión continua de líquido ascítico se ha demostrado beneficioso en pacientes con SHO grave, ya que aumenta el volumen plasmático circulante y permite una recuperación más rápida [137].

La ascitis severa se asocia frecuentemente a hidrotórax derecho, por el paso de fluidos a través del conducto torácico. La paracentesis suele ser efectiva resolviendo el hidrotórax y la toracocentesis debe ser reservada para aquellos casos de derrame pleural bilateral severo y persistente [63].

**9.3. Expansores de volumen.** Uno de los tratamientos principales del SHO consiste en incrementar el volumen plasmático, ya que la hipovolemia caracteriza a este síndrome [23]. Entre los diferentes expansores de volumen disponibles actualmente se encuentran la albúmina, el hidroxietileno de almidón y el dextrano de bajo peso molecular [138]. La albúmina es de primera elección [1] ya que es la proteína que



pasa al tercer espacio, no es tóxica, está libre de contaminación viral y su vida media es larga. El uso de 200 ml de albúmina al 25% cada 4 a 6 horas suele ser efectivo. La infusión de albúmina debe realizarse lentamente para evitar una corrección excesivamente rápida de la hemoconcentración con posterior hemodilución y aumento del volumen de líquido libre en el tercer espacio.

**9.4. Furosemida.** Este potente agente natriúretico permite incrementar el volumen urinario y la excreción de sodio. Si se observa hipotensión o hemoconcentración se debe contraindicar el empleo de diuréticos. La furosemida restablece la función prerrenal disminuyendo el riesgo de necrosis tubular y fallo renal en estas pacientes. Es un diurético de acción muy rápida y su vida media corta nos permite un control adecuado de las dosis en función de la diuresis. Se recomienda el empleo de 10 mg iv cada 4 horas tras la administración de 100 gramos de albumina. Debemos suspender el tratamiento con furosemida cuando se alcance una diuresis mayor de 1000 mL/día durante 48 horas y evitar su administración en pacientes con un hematocrito > 38%, ya que la excesiva hemoconcentración favorece los fenómenos trombóticos.

**9.5. Disminuir la ingesta de sodio.** Se recomienda disminuir la ingesta de sodio a 60 mEq/día [133]. El objetivo es crear un balance negativo que disminuya el tercer espacio en estas pacientes. Sin embargo, su beneficio durante la estimulación ovárica no se ha demostrado.

**9.6. Evitar la hiperkaliemia.** El exceso de potasio se ha asociado con trastornos del ritmo cardiaco. Se pueden emplear tratamientos que incrementan el paso de potasio al espacio intracelular (insulina y glucosa, bicarbonato sódico, albuterol) o proteger al corazón frente a los efectos de niveles de potasio elevados con gluconato cálcico. Las manifestaciones en el electrocardiograma son las siguientes: prolongación de los intervalos PR y QRS, depresión del segmento ST y ondas T pronunciadas que indican la necesidad de tratamiento inmediato con gluconato cálcico. Existen resinas intercambiadoras de cationes que disminuyen la concentración de potasio, pero su mecanismo de acción es lento (1-2 horas) y deben ser administradas vía oral o vía rectal.



**9.7. Control estricto del balance hidroelectrolítico.** Se recomienda el control diario de la ingesta de líquidos y la diuresis de estas pacientes. La corrección de la volemia es fundamental para mejorar la sintomatología de estas pacientes. Los niveles de sodio, potasio y cloro son buenos indicadores de hemodilución y en algunas ocasiones puede ser necesario la suplementación de alguno de estos electrolitos.

**9.8. Vigilancia de la función hepática.** Los cambios hemodinámicos y los niveles elevados de estradiol pueden afectar a los diferentes parámetros de función hepática, que debe ser cuidadosamente vigilada y corregida [10].

**9.9. Seguimiento de los parámetros hemostáticos.** Los fenómenos tromboembólicos que caracterizan el estadio crítico de este síndrome deben ser evitados con un buen seguimiento del recuento de plaquetas, tiempo de protrombina y niveles de fibrinógeno. El dímero-D y el complejo plasmina  $\alpha_2$ -antiplasmina son buenos marcadores de que el sistema fibrinolítico ha sido activado y, por tanto, son marcadores clínicos de la condición procoagulante de este síndrome [139]. Si sospechamos que el riesgo de trombosis está aumentado debemos iniciar la heparinización de la paciente con heparina de bajo peso molecular subcutánea.

Las pacientes con SHO grave deben ser anticoaguladas desde el ingreso, debido a la hemoconcentración. La profilaxis se realizará con heparina 5000 UI o heparinas de bajo peso molecular a dosis profilácticas de 40 mg/día, por vía subcutánea.

**9.10. Cuidados críticos.** Son muy pocos los casos que pueden llegar a necesitar cuidado crítico si se instaura un tratamiento adecuado y rápido que incluya profilaxis antitrombótica, manejo de líquidos intravenosos y paracentesis evacuadora. Sin embargo, en algunos casos puede ocurrir un fallo renal que no responde a los tratamientos iniciales, fenómenos trombóticos a pesar de las medidas de anticoagulación o alteración de la función pulmonar con acidosis respiratoria a pesar de haber realizado la paracentesis. En estos casos, el trabajo en equipo con especialistas en cuidados críticos se hace indispensable.

El seguimiento de estas pacientes requiere la vigilancia de las complicaciones tromboembólicas, del fallo renal y de las complicaciones pulmonares. El fallo renal



habitualmente responde a dopamina (0,18 mg/kg/hora) que favorece la dilatación de los vasos renales e incrementa el flujo sanguíneo [140, 141]. Se debe colocar un catéter para medir la presión venosa central y evitar la sobrecarga cardiaca, secundaria a la utilización de expansores de volumen. En algunos casos será necesario el empleo de ventilación asistida y toracocentesis para mantener la saturación de oxígeno. Por último, se deben tener en cuenta las complicaciones que puedan requerir cirugía, como la ruptura de algún quiste lúteo, la torsión ovárica o la gestación ectópica. En estos casos el equipo de anestesia, probablemente no familiarizado con este tipo de pacientes, deberá conocer la fisiopatología de este síndrome para evitar los riesgos adicionales [142].

## 10. RESULTADOS OBSTÉTRICOS DE LAS PACIENTES CON SHO

La sintomatología de estas pacientes puede afectar negativamente a la gestación. La inestabilidad hemodinámica, el fallo multiorgánico, los niveles elevados de estradiol y de otros mediadores desconocidos pueden producir efectos todavía desconocidos sobre el desarrollo de la gestación. Las gestantes deben ser consideradas pacientes de alto riesgo y como tal tratadas.

Las dos complicaciones tempranas asociadas al SHO son el **embarazo ectópico** y el **aborto**. El embarazo ectópico, de por sí aumentado en las TRA, es más frecuente en las pacientes con SHO, debido a la alteración funcional y anatómica de las trompas y a la presencia de ovarios aumentados de tamaño. La incidencia de aborto clínico y aborto bioquímico en las gestaciones complicadas por SHO es un 27% a 40% superior a la descrita en las TRA en general [143].

Abramov *et al* [144] revisaron retrospectivamente los resultados obstétricos de 163 pacientes que desarrollaron un SHO grave y la mayor parte de las variables perinatales se alteraron significativamente. La **tasa de prematuridad** fue mayor que en el resto de ciclos de fecundación *in vitro*, un 44.2% vs 24% para gestaciones múltiples y un 27.6% vs 9% para gestaciones únicas. La prevalencia de **rotura prematura de membranas** también fue claramente mayor, 17.7% vs 4.9%. La incidencia de **bajo peso al nacimiento** fue de un 63% en los casos de hiperestimulación frente a un 24 % en el resto de ciclos de FIV. Sin embargo, no se encontraron diferencias en la frecuencia de cesáreas en ambos grupos. Wiser *et al* [145] no han demostrado mayor incidencia de **preeclampsia** y



**diabetes gestacional** en las pacientes diagnosticadas de un SHO cuando se comparan con gestaciones conseguidas tras un ciclo de FIV que no desarrollaron dicho síndrome.

Además de estos peores resultados obstétricos, Abramov *et al* [144] señalan una mayor tasa de gestación en las pacientes que desarrollaron el SHO comparado con el resto de pacientes de ciclos de FIV. Simon *et al* [79] ya habían demostrado que los niveles plasmáticos elevados de estradiol disminuyen la tasa de implantación. Y debemos tener en cuenta la aparición bifásica de este síndrome: una primera fase entre los 3-9 días tras la administración de la hCG y otra segunda fase más tardía, solo desarrollada en los ciclos que consiguen gestación. Por tanto, no hay mas gestaciones en las pacientes hiperestimuladas, sino que el SHO tardío es una consecuencia de la gestación, como muy bien aclararon Pellicer *et al* [146].

Lo que parece claro es que estas pacientes requieren un seguimiento estricto para minimizar las complicaciones derivadas del SHO [144]. Podemos emplear estrategias preventivas como la criopreservación de embriones o la reducción del número de embriones a transferir, que nos permiten disminuir la gravedad de este síndrome. Aunque De Neubourg *et al* [147] han observado que la transferencia de un único embrión no ha disminuido la incidencia del SHO en los últimos 5 años, demostrando que el SHO tardío presenta la misma frecuencia en gestaciones únicas que en gestaciones gemelares.

## 11. CONCLUSIONES SOBRE EL SHO

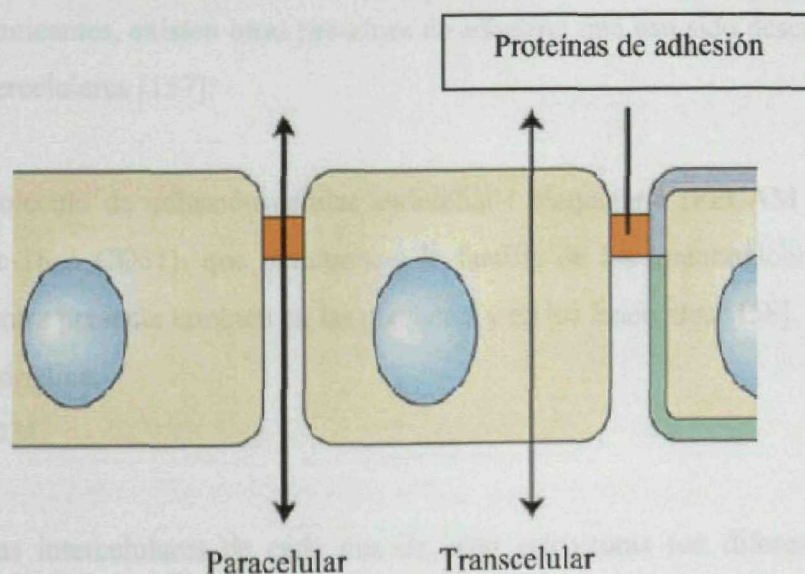
El SHO es una complicación iatrogénica de las técnicas de reproducción asistida, tanto de la estimulación ovárica controlada como de la inducción de la ovulación. Todos los ginecólogos que administran gonadotropinas y manejan este tipo de casos deben identificar cuidadosamente todas aquellas pacientes en riesgo, ya que la prevención por ahora es el mejor tratamiento del que disponemos [148]. Una vez desarrollado el SHO, se deben poner en marcha todos aquellos tratamientos que intentan disminuir la morbi-mortalidad y considerar siempre el riesgo que tienen estas pacientes. Los casos leves y moderados pueden ser tratados de forma ambulatoria, pero la evaluación diaria de la paciente es esencial. Los casos graves pueden poner en peligro la vida de la paciente y el seguimiento estricto y hospitalario en estos casos resulta esencial.



## PROTEÍNAS DE ADHESIÓN CELULAR: PAPEL DE LA CADERINA DEL ENDOTELIO VASCULAR

La capa de células endoteliales de los vasos sanguíneos limita el paso de proteínas plasmáticas y células circulantes entre la sangre y los tejidos próximos [149]. Esta función es finamente regulada por dos sistemas diferentes (figura 1), que son el sistema transcelular y el paracelular [150]:

- **Transcelular.** Este sistema permite el paso de solutos plasmáticos a través del citoplasma de la célula endotelial, gracias a la acción de sistemas vesiculares regulados por organelas citoplasmáticas.
- **Paracelular.** La permeabilidad endotelial para las células circulantes y las proteínas plasmáticas está controlada en parte por las uniones intercelulares (uniones homotípicas) y a la matriz extracelular (uniones heterotípicas). Aparte de su papel en la formación de uniones, cada vez se observa mayor evidencia que sugiere que dichas uniones pueden transferir señales celulares y ser responsables de la inhibición del crecimiento celular, de la apoptosis y de la polaridad celular.



**Figura 1.** Mecanismos de transporte a través de la barrera endotelial

Las uniones interendoteliales juegan un papel importante en la regulación de las funciones endoteliales, como la **vasculogénesis**, la **angiogénesis** y la **permeabilidad**



**vascular.** Las uniones entre las células endoteliales son estructuras complejas formadas por diferentes moléculas de adhesión [151]. En las células endoteliales se describen tres estructuras que participan en las uniones intercelulares [152]:

1. Las **uniones estrechas** o *tight junctions* (TJ). Las TJ están formadas por diferentes estructuras moleculares. Se han descrito tres tipos de proteínas transmembrana, la ocludina [153], la claudina [154] y las moléculas de la adhesión de las uniones (*junctional adhesion molecule* ó JAM) [155]. Dentro de las células, diversas moléculas del citoesqueleto se concentran en las TJ como la zona ocluyente (*zonula occludens* 1 ó ZO-1), la cingulina y la 7H6 [152, 156].
2. Las **uniones adherentes** o *adherens junctions* (AJ) (ver más adelante).
3. Las **uniones comunicantes** o *gap junctions* (GJ). Estas uniones permiten el paso de pequeñas moléculas e iones entre las células.

Todas estas estructuras están formadas por proteínas transmembrana específicas, en las cuales su región extracelular favorece la adhesión homotípica intercelular y su región citoplasmática se une al citoesqueleto.

Además de estos tres sistemas, las uniones estrechas, las uniones adherentes y las uniones comunicantes, existen otras proteínas de adhesión que han sido descritas en los contactos intercelulares [157]:

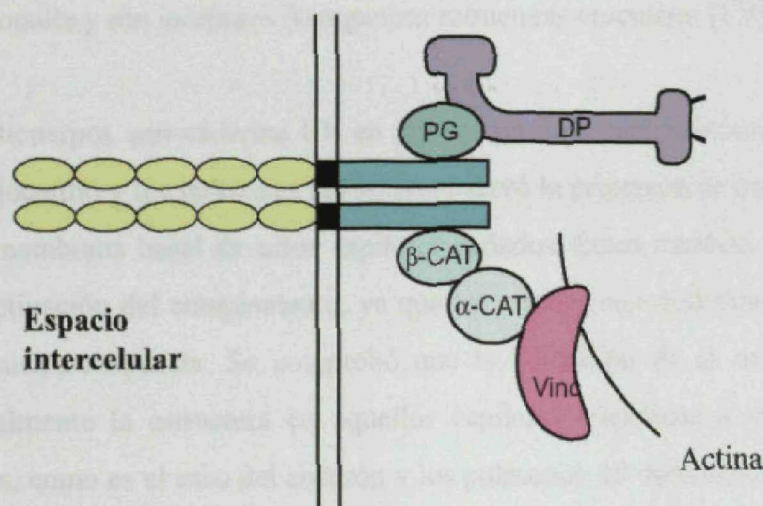
- a) La molécula de adhesión celular endotelial / plaquetaria (PECAM ó S-endo-1/Muc-18 ó CD31), que pertenece a la familia de las inmunoglobulinas y se encuentra presente también en las plaquetas y en los leucocitos [158].
- b) La endogлина.
- c) El CD34.

Las moléculas intercelulares de cada una de estas estructuras son diferentes y esto podría explicar la especificidad de estos complejos en la transmisión de señales celulares.



## 1. UNIONES ADHERENTES

Las AJ están situadas a lo largo de todo el árbol vascular y están formadas por proteínas transmembrana pertenecientes a la familia de las caderinas [159]. Las células endoteliales expresan una caderina específica llamada **caderina del endotelio vascular (caderina EV)** o caderina 5 [160]. Como otros miembros de esta familia, la porción intracelular se une a tres proteínas citoplasmáticas denominadas cateninas:  $\beta$ -catenina, plakoglobina y a la catenina p120 [161, 162]. La  $\beta$ -catenina y la plakoglobina se unen a la  $\alpha$ -catenina, que favorece el anclaje a los filamentos de actina del esqueleto celular (figura 2). Aunque el dominio extracelular de la caderina EV es necesario para la adhesión celular, la asociación intracelular a las cateninas y al citoesqueleto es necesaria para la estabilización del complejo y para el control de la permeabilidad [163].



**Figura 2.** Caderina EV [164]

(DP) desmoplakina, (PG) plakoglobina, ( $\beta$ -CAT)  $\beta$ -catenina, ( $\alpha$ -CAT)  $\alpha$ -catenina, (Vinc) vinculina

Las caderinas favorecen las uniones homotípicas entre las células y esta adhesión es calcio dependiente. Gao *et al* [165] demostraron que la adición de un agente quelante del calcio, como el etilen diamino tetraacético (EDTA) a pulmones de ratón, era capaz de romper las uniones intercelulares de la caderina EV y aumentar el cociente de



permeabilidad capilar. La reperusión de dichos pulmones con calcio, permitió la formación de nuevos complejos de caderina EV y el restablecimiento de la integridad de la pared vascular.

Las AJ son estructuras dinámicas que pueden variar en su composición y fuerza adherente según las necesidades celulares. Las AJ, y en particular la caderina EV, incrementa la permeabilidad vascular en respuesta al VEGF [166, 167], **histamina** [168,169] y **fibrina** [170, 171]. La importancia de las AJ radica en su capacidad para regular la permeabilidad según los diferentes estímulos que actúan sobre el endotelio vascular.

Se ha descrito la estrecha relación que existe entre el citoesqueleto y la caderina EV [172]. Cuando se consigue la inhibición de esta molécula se produce una reorganización de las fibras de actina del esqueleto celular y una pérdida de las uniones intercelulares. Esto produce un aumento de la permeabilidad y de la migración transendotelial de los neutrófilos [173]. Las células endoteliales con una mutación en el gen de la caderina EV presentan alteraciones funcionales y son incapaces de organizar estructuras vasculares [174].

El empleo de anticuerpos anti-caderina EV en ratones produjo edema intersticial, más marcado en el miocardio y los pulmones [175]. Se observó la presencia de neutrófilos y plaquetas en la membrana basal de estos capilares dañados. Estos cambios no fueron atribuidos a la activación del complemento, ya que los ratones con deficiencia del C5, presentaron la misma respuesta. Se comprobó que la inhibición de la caderina EV modificó especialmente la estructura en aquellos capilares sometidos a cambios de presión continuos, como es el caso del corazón y los pulmones. El dominio extracelular de la caderina EV es muy sensible a la digestión proteolítica, por tanto la activación de los neutrófilos y la liberación de enzimas proteolíticas incrementan la permeabilidad vascular, sobre todo en zonas de inflamación e isquemia-reperusión, caracterizadas por la acumulación de neutrófilos y edema en la microcirculación [175].



## 2. LA FAMILIA DE LAS CADERINAS

A principios de los años ochenta Peyrieras *et al* [176] describieron por primera vez la caderina E (uvomorulina), una glicoproteína de membrana implicada en la compactación celular. Posteriormente, Nose *et al* [177] describieron la caderina N, una proteína transmembrana de adhesión celular, calcio dependiente y con expresión en el tejido neuronal. Se observó que todas estas moléculas compartían secuencias de aminoácidos con la caderina del pollo (*L-CAM / E-cadherin*) y con la caderina placentaria, la caderina P.

Desde entonces, se han descrito diversos miembros de esta familia de proteínas con características comunes:

- Sus fracciones extracelulares contienen dominios calcio dependientes, que varían de 5 a 34 dominios diferentes.
- Se anclan a una región transmembrana con alguna excepción, como la caderina T que lo hace a un anclaje de glicosilfosfatidilinositol.
- La región intracitoplasmática de cada una de ellas permite diferentes interacciones y por tanto funciones celulares diversas.

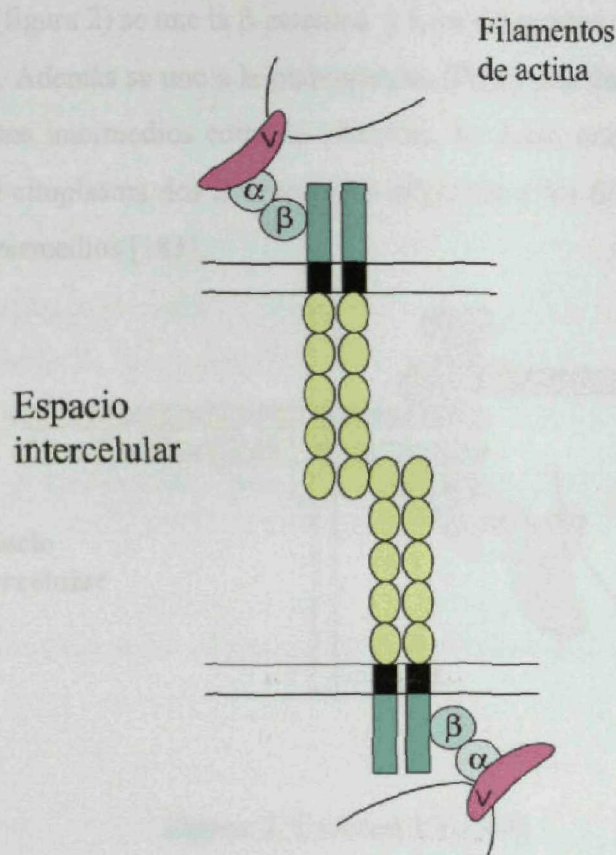
Las caderinas se han implicado en varios procesos biológicos como la adhesión y la morfogénesis celular, la organización del citoesqueleto y la migración celular. También se ha estudiado la función de estas proteínas transmembrana en procesos patológicos como el cáncer [178].

### 2.1. Estructura y función de las caderinas

**2.1.1. Las caderinas clásicas** (figura 3) son proteínas que participan en las uniones intercelulares a través de 5 dominios extracelulares dependientes del calcio. Las caderinas E y N son las mejor estudiadas. Su expresión en la superficie celular permite las uniones celulares y la fracción citoplásmica se une a la  $\beta$ -catenina o a la



plakoglobina (PG) y posteriormente a la  $\alpha$ -catenina, a la vinculina y a los filamentos de actina [179].



**Figura 3.** Caderina clásica [164]

( $\alpha$ )  $\alpha$ -catenina, ( $\beta$ )  $\beta$ -catenina, (v) vinculina

La caderina EV pertenece a la familia de las caderina clásicas. En las células endoteliales se observan niveles similares de caderina N, pero mientras que la caderina N se distribuye por toda la membrana celular, la caderina EV se localiza solamente en las AJ de las uniones intercelulares.

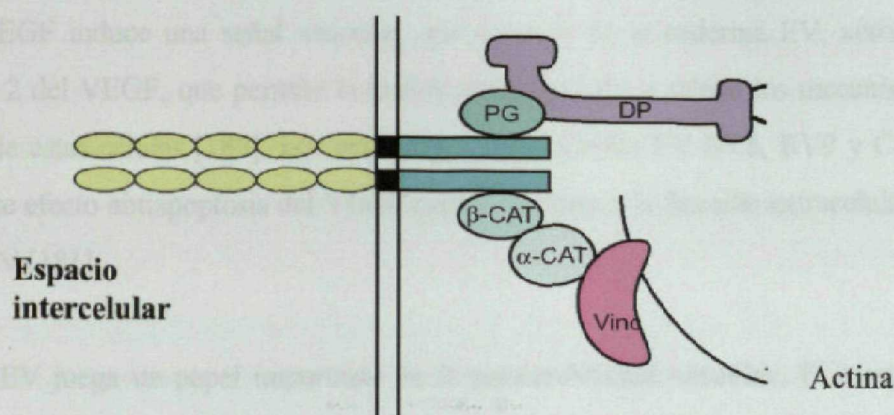
Navarro *et al* [180] demostraron que esta distribución a lo largo de la membrana de las células endoteliales se produce porque ambas proteínas tienen papeles diferentes. La caderina EV favorece la unión entre las células endoteliales y la caderina N puede ser la responsable de la unión del endotelio a otros tipos celulares que expresan también la caderina N como las células musculares o los pericitos.

La caderina EV es específica de las células endoteliales, y repite la misma estructura que el resto de la familia de las caderinas, con 5 dominios extracelulares dependientes de calcio y su unión a los filamentos de actina a través de las cateninas. Actualmente se



han descrito diferentes anticuerpos monoclonales contra esos dominios, como el Cad 5, BV6, BV9, TEA 1.31 y Hec 1.2. [181].

La caderina EV (figura 2) se une la  $\beta$ -catenina y a los filamentos de actina a través de la  $\alpha$ -catenina [182]. Además se une a la plakoglobina (PG) y a la desmoplakina (DP) para unirse a filamentos intermedios como la vinculina. Es decir, que una misma molécula forma dentro del citoplasma dos interacciones diferentes a los filamentos de actina y a los filamentos intermedios [183].



**Figura 2.** Caderina EV [164]

(DP) desmoplakina, (PG) plakoglobina, ( $\beta$ -CAT)  $\beta$ -catenina, ( $\alpha$ -CAT)  $\alpha$ -catenina,  
(Vinc) vinculina

Una de las primeras funciones de esta proteína es la **vasculogénesis** o formación de vasos embrionarios. Su expresión es imprescindible para la organización vascular del embrión. Al principio del desarrollo embrionario se inicia la expresión de la caderina EV en las células mesodérmicas del mesénquima del saco vitelino. Posteriormente, aparecen específicamente en los islotes de las células precursoras que formaran las células endoteliales. La mutación del gen de la caderina EV interrumpe el desarrollo a las 9 semanas más 5 días de vida embrionaria, por las alteraciones que se producen en la remodelación vascular del saco vitelino. Esta mutación en las células endoteliales en cultivo produce:

- Pérdida de la inhibición del crecimiento celular por contacto.
- Mayor sensibilidad a los estímulos apoptóticos.



Estos dos fenómenos alteran el crecimiento normal de los cultivos celulares endoteliales [184].

La caderina EV participa en la **angiogénesis y remodelación vascular**. La rotura de sus uniones intracelulares no impide la formación de plexos vasculares, lo que indica que su fracción extracelular es la única imprescindible en este proceso [185]. Sin embargo, la molécula entera es necesaria para el desarrollo embrionario en etapas tan precoces como el 9º día. El VEGF induce una señal vascular, que a través de la caderina EV, activa el receptor tipo 2 del VEGF, que permite la proliferación vascular e inhibe los mecanismos apoptóticos de estas células [185]. Los anticuerpos anti-caderina EV BV6, BV9 y Cad 5 previenen este efecto antiapoptosis del VEGF cuando se unen a la fracción extracelular de la caderina EV [181].

La caderina EV juega un papel importante en la **permeabilidad vascular**. El complejo caderina EV- $\beta$ -catenina es el blanco de los factores que estimulan el aumento de la permeabilidad vascular. En este complejo se ha descrito la presencia de una proteína tirosin fosfatasa (SHP2) unida de forma específica a la  $\beta$ -catenina. La trombina es capaz de inducir la fosforilación de esta proteína que provoca su disociación del complejo y consecuentemente reduce la adhesión celular e incrementa la permeabilidad vascular [186].

Las caderinas clásicas poseen una **actividad antitumoral** basada en sus propiedades de adherencia celular. Estas proteínas impiden la separación celular y por tanto bloquean la invasión tumoral y la diseminación metastásica, pero además las caderinas intervienen directamente en la inhibición de la proliferación celular.

Cuando se produce la separación del fragmento intracelular de las caderinas se mantienen las propiedades de adherencia celular, pero se pierde la capacidad de inhibir el crecimiento celular [187]. Esto sugiere que las caderinas transfieren señales de inhibición del crecimiento celular a través de su asociación con las cateninas o con otras moléculas citoplásmicas [188]. Navarro *et al* [163] demostraron que sólo la fracción extracelular es la responsable de la adhesividad celular. En cambio, es la unión al citoesqueleto la que permite controlar la permeabilidad y favorece la migración celular. La rotura de los filamentos de actina con citocalasina D alteró el control sobre la permeabilidad de cultivos celulares en monocapa y aquellas células con el fragmento



intracelular de la caderina EV alterado presentaron similar comportamiento, favoreciendo el aumento de la permeabilidad a moléculas de peso molecular alto [95].

**2.1.2. Las caderinas desmosomales** son las proteínas transmembrana que forman parte de los desmosomas. Este tipo de uniones está presente en tejidos sometidos a diversas fuerzas mecánicas como la epidermis y el miocardio. Se han descrito dos tipos, la desmocolina (DSC) y la desmogleína (DSG) que conservan una estructura similar a las caderinas clásicas con sus 5 dominios extracelulares [189]. La fracción extracelular produce interacciones tanto homofilicas como heterofilicas entre las células adyacentes y su porción citoplasmática se une al esqueleto celular.

Se ha demostrado que la DSG es el antígeno de determinadas enfermedades autoinmunes. Es el caso del pénfigo vulgar, donde los autoanticuerpos afectan a la DSG 3, y una forma más severa como el pénfigo foliaceo que afecta a la DSG 1 [190].

La DSG 1 también se afecta durante la proteólisis exfoliativa que produce la toxina A del *Staphylococcus aureus* [191]. Múltiples mutaciones de la DSG 1 producen alteraciones cutáneas como el queratoderma estriado palmoplantar, en el cual los pacientes presentan bandas hiperqueratósicas en las palmas y en las plantas [192]. Se ha podido observar que la interacción de estos complejos con los filamentos del citoesqueleto regulan la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 [193].

**2.1.3. Protocaderinas.** La familia de las protocaderinas es amplia. Poseen 7 dominios extracelulares dependientes del calcio. Se han descrito no sólo en vertebrados, sino también en diversos organismos multicelulares, lo que indica que son caderinas ancestrales que han originado otras familias diferentes.

En los mamíferos se encuentran sobre todo en el cerebro y se han descrito más de 80 tipos en este tejido. Recientemente tres grupos de estas proteínas, que abarcan un total de 52 protocaderinas, han sido identificados en el cromosoma 5q31.

Todas las protocaderinas comparten la misma fracción citoplasmática y su porción extracelular varía, lo que favorece interacciones celulares diferentes [194]. Shapiro *et al* [195] han propuesto que las protocaderinas pueden estar implicadas en la sinapsis



neuronal, ya que sus propiedades estructurales y su presencia en la zona de la sinapsis puede favorecer la transmisión de señales entre las neuronas.

Telo' *et al* [196] identificaron la caderina EV-2, perteneciente a la familia de las protocaderinas. Esta proteína comparte la fracción extracelular con la caderina EV, pero no se une al citoesqueleto celular. Se ha comprobado que favorece la adhesión celular pero no interviene ni en la permeabilidad, ni en la inhibición de la migración, ni en el crecimiento celular. Estos datos son consistentes con la idea de que la región extracelular permite la adherencia celular, pero las consecuencias funcionales de esta asociación dependen del fragmento intracelular. La asociación de la caderina con las cateninas y la actina refuerza la adhesión celular, pero es imprescindible para transferir las señales que limitan el crecimiento y la migración celular. Diferentes estructuras citoplasmáticas son responsables de respuestas celulares diferentes.

**2.1.4. Las caderinas con 7 segmentos transmembrana (7TM)** son otro grupo de caderinas con una fracción extracelular implicada en la adhesión homotípica y el establecimiento de la polaridad celular. Se caracterizan por una porción intramembrana formada por 7 segmentos y una porción intracelular como el resto de las caderinas [197].

**2.1.5. La familia FAT.** Todos los miembros de esta familia poseen dominios extracelulares muy largos y, probablemente, estos dominios no estén únicamente implicados en la adhesión celular. Se les ha relacionado con genes supresores de tumores y suelen estar presentes en tejidos con alta tasa de proliferación y son menos prevalentes en tejidos adultos. Se piensa que pueden facilitar la separación celular que permite la migración celular o incluso actuar como sensores de proximidad y bloquear así la proliferación celular [198].

**2.1.6. La caderina T** fue originalmente descrita en el cerebro de embriones de pollo. Se le ha atribuido un papel en las señales intercelulares más que en la adhesión celular [199].

La gran diversidad de estructuras de los miembros de la familia de las caderinas se ha adaptado para llevar a cabo múltiples funciones de reconocimiento intercelular. Principalmente han sido relacionadas con la adhesión celular, pero participan en el



reconocimiento celular, la organización del citoesqueleto y el control del crecimiento celular.

Los genes de las caderinas clásicas se encuentran en el cromosoma 16q22 (disponible en la base de datos del genoma humano en [www.gdb.org](http://www.gdb.org)), los genes de las caderinas desmosomales están situados sobre el cromosoma 18q22 [200] y las tres protocaderinas (PCDH $\alpha$ , PCDH $\beta$  y PCDH $\gamma$ ) se sitúan sobre el cromosoma 5q31 y comparten una organización genómica similar. Curiosamente, la región 5q31 es un locus de potencial susceptibilidad para la esquizofrenia en familias israelitas y alemanas [201].

### 3. CADERINA EV Y PERMEABILIDAD VASCULAR: PAPEL DEL VEGF, LA HISTAMINA Y LA FIBRINA

#### 3.1. PAPEL DEL VEGF EN LA PERMEABILIDAD VASCULAR

El VEGF y sus receptores representan la llave del sistema que regula el **crecimiento** y la **diferenciación endotelial** durante el desarrollo embrionario, al igual que en determinadas situaciones fisiológicas y patológicas en el adulto.

El VEGF es un sistema de ligandos y receptores presentes en muchas células del organismo. Se han descrito cinco isoformas del VEGF en humanos. El gen del VEGF está constituido por 8 exones. Los exones 1 a 5 y 8 están siempre presentes en el ARNm de VEGF, mientras que la expresión de los exones 6 y 7 está regulada por roturas alternativas. Este fenómeno hace que existan 5 isoformas diferentes del ligando, con distintas longitudes pero con una región común, concretamente las isoformas VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub>, y VEGF<sub>206</sub> [202]. Las isoformas VEGF<sub>121</sub> y VEGF<sub>165</sub>, parecen implicadas en el proceso de **angiogénesis** [203] y son **productos característicos del ovario** [204].

Al contrario que otros factores de crecimiento angiogénico, el VEGF es específico para las células endoteliales, favoreciendo su división y permeabilidad. Se ha demostrado que estimula la quimiotaxis y la migración celular y ambos fenómenos dependen de la dosis y duración del estímulo.



### 3.1.1. Receptores del VEGF

Los receptores para el VEGF están presentes en las células endoteliales y pertenecen a la familia de las tirosin kinasas. También están presentes en las células de la teca interna de los folículos humanos.

Se han identificado dos receptores de membrana específicos para el VEGF, el receptor-1 (VEGFR-1; Flt-1) y el receptor-2 (VEGFR-2; Flk-1/KDR)[205]. El receptor-2 está implicado en la regulación de la permeabilidad vascular, la angiogenesis y la vasculogenesis, y se investiga su implicación en procesos oncológicos de origen ginecológico. Recientemente, Calera *et al* [206] han encontrado una relación directa entre la expresión de caderina EV y la cantidad de receptor-2 expresado por las células endoteliales, demostrando que la caderina EV es capaz de incrementar la vida media de este receptor *in vitro*.

Se han estudiado diferentes moléculas bloqueantes del VEGFR-2 en modelos animales que reducen el tamaño tumoral y la ascitis. Aunque los mecanismos que desarrollan la ascitis sean diferentes en las neoplasias y en el SHO, todavía no se había logrado impedir la ascitis en el SHO a través del sistema VEGF hasta que Gómez *et al* [32] mostraron que un agente bloqueante del receptor-2, el SU5416, previene los cambios vasculares en ratas hiperestimuladas.

### 3.1.2. VEGF y caderina EV

El VEGF y sus receptores son expresados durante la vasculogénesis embrionaria y la angiogénesis tumoral, al igual que en determinados procesos angiogénicos durante la vida adulta.

La formación de nuevos vasos implica la degradación de la matriz extracelular, combinada con la migración de las células endoteliales de los capilares más próximos. Uno de los primeros eventos, que probablemente ocurre durante este proceso, es el debilitamiento de los contactos intercelulares entre las células endoteliales y la transición de un estado quiescente a un estado dinámico de migración celular. La



regulación de la motilidad y adhesión de las células endoteliales a la matriz extracelular es uno de los aspectos más importantes en el proceso de la angiogenesis. Además se ha comprobado que estas áreas de replicación endotelial exhiben un incremento en su permeabilidad vascular [207].

Los mecanismos responsables de la regulación de la permeabilidad vascular no están completamente aclarados. Se ha comprobado que el VEGF induce fenestraciones, las cuales podrían estar implicadas en la modulación de dicha permeabilidad. Alternativamente, el VEGF puede actuar sobre las uniones intercelulares, que limitan el flujo paracelular entre las células endoteliales [167].

En la adherencia celular se encuentran implicadas una gran variedad de moléculas, que incluyen el complejo caderina-catenina, y un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas implicado en la adhesión celular (PECAM / CD31).

Las caderinas son cadenas simples de polipéptidos transmembrana que participan en la adherencia celular mediante uniones homofílicas, dependientes del calcio, y están asociadas a la región de las uniones adherentes.

En este dominio de membrana, las caderinas forman complejos proteicos con las cateninas intracitoplasmáticas. Se une a la  $\beta$ -catenina,  $\alpha$ -catenina y plakoglobina y directamente con el citoesqueleto celular a través de los filamentos de actina.

La caderina EV se expresa selectivamente en las células endoteliales en cultivos *in vitro*. Se conoce su importancia en la regulación de la permeabilidad, migración y formación de nuevos vasos sanguíneos [208]. Previamente, se sabía que el incremento en la fosforilación de los residuos tirosina en las uniones intercelulares y en los contactos célula-matriz extracelular se correlacionaba con fenómenos biológicos como la migración celular, la motilidad celular y la siembra metastásica de las células tumorales [209, 210, 211]. Recientemente, se ha podido comprobar que la fosforilación de los residuos tirosina de la caderina EV, p120 y  $\beta$ -catenina inicia la pérdida de confluencia celular y favorecen la migración celular [166].

Esser *et al* [167] demostraron por primera vez la relación entre el VEGF y la caderina EV. Sobre cultivos endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), observaron un



incremento significativo en la fosforilación de los residuos tirosina de diversos componentes de las uniones adherentes tras el estímulo con VEGF. En concreto, observaron esta fosforilación sobre la caderina EV,  $\beta$ -catenina, plakoglogina, p120 y PECAM. Esa fosforilación de las proteínas transmembrana se asoció con la pérdida de integridad de las uniones intercelulares. Como el VEGF estimula la migración celular y la permeabilidad, parece que la fosforilación de los residuos tirosina de la caderina EV y las cateninas puede estar directamente relacionada con los cambios que se producen en la adherencia celular durante estos procesos.

Posteriormente, Lambeng *et al* [212] demostraron *in vivo* la relación ya demostrada *in vitro* entre el VEGF y la caderina EV. Estos autores observaron un incremento en la fosforilación de los residuos tirosina de la caderina EV en el pulmón, en el útero y ovarios de ratones. Esta fosforilación fue mas marcada a nivel de útero y ovarios en aquellos ratones hiperestimulados tras un tratamiento con hCG. Pudieron comprobar también un incremento en la expresión de VEGFR-2, estableciendo una relación directa entre el VEGF y la caderina EV durante los procesos de angiogénesis ovárica y aumento de la permeabilidad a ese nivel.

Aunque las células endoteliales expresan ambos receptores para el VEGF, VEGFR-1 y VEGFR-2, parece que el responsable de estos cambios es este último. Se sabe que las células endoteliales expresan 10 veces más VEGFR-2 que VEGFR-1 [213] y sólo aquellas células que expresan VEGFR-2 responden al VEGF con cambios en la morfología celular, reorganización de los filamentos de actina, cambios en el contorno de las membranas celulares y quimiotaxis [214]. El empleo de una molécula sintética capaz de estimular el VEGFR-1 (PIGF152) no incrementa la fosforilación de las proteínas transmembrana, ni los componentes de las uniones adherentes [167].

### 3.1.3. VEGF y SHO

Varios estudios sugieren que el mediador del SHO tiene un origen ovárico. En mujeres hiperestimuladas, el ovario produce VEGF y otras citoquinas. Las células de la granulosa luteinizadas en el folículo ovárico parecen ser la principal fuente origen del VEGF en respuesta al estímulo con hCG [32, 33, 90].



Albert *et al* [16] demostraron que el endotelio tiene receptores para la hCG y que responde al estímulo con hCG, liberando VEGF y aumentando la expresión del VEGFR-2 en la superficie celular. Esto sugiere que las células endoteliales están implicadas en la patogénesis del SHO, incrementando la permeabilidad vascular y no sólo es responsabilidad de las células de la granulosa luteinizadas.

En un modelo animal de ratas hiperestimuladas se demostró que aquellas ratas ovariectomizadas no desarrollaron ascitis ni aumento de la permeabilidad vascular, apoyando el origen ovárico del VEGF [32].

El cuerpo lúteo parece ser el responsable del origen del VEGF [215]. Empleando inmunohistoquímica, se demostraron niveles elevados de VEGF tanto en las células de la granulosa como en los vasos neoformados del cuerpo lúteo. Esto puede ser interpretado como la coparticipación del endotelio y del ovario en la producción de VEGF o puede ser el resultado de la liberación rápida del VEGF desde las células luteinizadas a los capilares próximos. Se observaron estos mismos resultados en la zona pelúcida de los folículos atrésicos y preovulatorios. Próximos trabajos empleando hibridación *in situ* deberán clarificar si el ovocito participa también como fuente de VEGF.

Sólo las isoformas VEGF<sub>121</sub> y VEGF<sub>165</sub> se expresan en el tejido ovárico humano sano, en el cáncer de ovario y en el SHO, mientras que el resto de las isoformas se expresan en otros tejidos [204]. Esto hallazgos pueden indicar que no son las diferentes isoformas del VEGF las responsables de la clínica, si no la variación en la cantidad de VEGF expresado las que justifican los diferentes patrones clínicos observados en la mujer sana, en la paciente con SHO o en la que padece un cáncer de ovario.

Las Src, una familia de proteínas kinasas muy abundantes en la membrana celular, relacionan el receptor del VEGF con la caderina EV y activan la señal que incrementa la permeabilidad vascular y el resto de fenómenos como la migración y quimiotaxis celular [216].

El inhibidor sintético del receptor-2, el SU5416 no afecta a la expresión del receptor ni a su afinidad por el VEGF. El SU5416 impide la activación de la familia Src y por tanto



el inicio de los cambios vasculares que favorecen la ascitis. La administración de este inhibidor tras la inducción de la ovulación con hCG puede prevenir los efectos vasculares de las pacientes que desarrollan SHO [32]. Weis *et al* [217] demostraron en ratones con un defecto en las Src, la disminución del tamaño de las metástasis pulmonares y hepáticas. Por tanto, la interrupción de la señal hacia las Src es capaz de estabilizar la barrera endotelial y suprimir la extravasación de células tumorales en modelos animales. Por supuesto, esta no es la única llave para prevenir y tratar la sintomatología del SHO y determinados procesos oncológicos, pero permite el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento basadas en el proceso fisiopatológico de este síndrome y no en los tratamientos empíricos empleados hoy en día.

De hecho, el crecimiento tumoral, la neoangiogenesis y la formación de ascitis se ha prevenido en animales con diferentes neoplasias de origen ovárico, empleando tratamientos que actúan sobre el sistema VEGF, especialmente sobre el receptor-2. Gómez *et al* [32] han mostrado la evidencia científica de que este mismo tipo de tratamientos pueden ser usados en el modelo animal del SHO. La seguridad de este tratamiento en humanos no está probada, ya que probablemente tenga efecto teratogénicos en estas pacientes que realizan los tratamientos al inicio de la gestación.

Otra estrategia en la prevención del SHO sería el empleo de un inhibidor soluble del VEGF. Este inhibidor evitaría la unión del VEGF a los receptores de membrana y por tanto podría prevenir fenómenos como el aumento de la permeabilidad vascular y la ascitis.

La actividad biológica del VEGFR-1 en las células endoteliales no está completamente descrita, pero se sabe que es el VEGFR-2 es el principal mediador de los efectos sobre la proliferación celular y la quimiotaxis.

El VEGFR-1 tiene una forma soluble (sVEGFR-1), producida por división alternativa del ARNm precursor, que podría ser también producido en el proceso de proteólisis [218]. En definitiva, esta forma soluble actúa biológicamente como inhibidor natural de las acciones del VEGF, al obligar que mucho ligando activo se una a ella y no a los receptores celulares. El sVEGFR-1 tiene una gran afinidad por el VEGF, de manera que no se detectan formas libres de VEGF activo ni en sangre ni en líquido folicular.



### 3.2. PAPEL DE LA HISTAMINA EN LA PERMEABILIDAD VASCULAR

El incremento de la permeabilidad microvascular por los mediadores de la inflamación, como la histamina, se ha relacionado con la activación de la contractilidad del citoesqueleto y con la formación de pequeños huecos o *gaps* entre las células endoteliales adyacentes, tanto *in vivo* como *in vitro* [168, 169]. Esto sugiere que las propiedades de las uniones intercelulares pueden estar afectadas durante el proceso de inflamación de una manera directa y específica [219].

Andriopoulou *et al* [220] confirmaron que el estímulo endotelial con histamina incrementa la fosforilación de los residuos tirosina de los componentes de las AJ. Como se ha comentado previamente, la fosforilación de los residuos tirosina es un mecanismo fundamental en la regulación de las AJ y de la caderina EV. En general, se ha asociado con la alteración de las propiedades adherentes de estas estructuras y favorecen la migración celular y su comportamiento invasivo. Sobre cultivos celulares demostraron el incremento en la permeabilidad tras el estímulo con histamina, a través de la fosforilación de las AJ y la formación de *gaps* intercelulares.

Varios trabajos han descrito mecanismos de acción diferentes de la histamina para inducir el aumento de la permeabilidad vascular:

1. Goeckeler *et al* [221] demostraron que la histamina induce la retracción celular y este efecto se regula por la fosforilación de una de las cadenas de miosina. Esa contracción celular favorece la formación de pequeños *gaps*, responsables del aumento de la permeabilidad.
2. Moy *et al* [222] comprobaron que la histamina no influye sobre la tensión isométrica de la propia célula, sino que disminuye las fuerzas centrífugas entre las distintas células. Esta observación se podría justificar por el efecto que la histamina tiene sobre las fuerzas de adhesión en las uniones intercelulares. Se sabe que la fosforilización de la caderina EV por la histamina se acompaña de un descenso en la cantidad de proteína unida al citoesqueleto [166]. Una posible explicación es que la histamina, que cambia el estado de fosforilación de la caderina EV y las cateninas, causa la disociación de la actina y esto produce un



descenso en las fuerzas de unión intercelulares. Se ha demostrado que la caderina N no se afecta por la histamina, lo que sugiere que su efecto es específico sobre los mediadores asociados a las AJ.

3. La histamina reduce la síntesis de ZO-1, proteína asociada a las TJ [223]. Todos estos datos refuerzan la idea de que la histamina aumenta la permeabilidad endotelial por el efecto que produce sobre las uniones intercelulares.

Por tanto, se piensa que la inducción de la fosforilación de los residuos tirosina de la caderina EV y de otras proteínas transmembrana, por parte de la histamina, puede explicar el incremento en la permeabilidad vascular y el edema que origina esta molécula.

### 3.3. PAPEL DE LA FIBRINA EN LA PERMEABILIDAD VASCULAR

La transformación del fibrinogeno en fibrina y su asociación con las plaquetas activadas es el evento final del proceso de coagulación. La generación de fibrina y su interacción con la pared vascular juega un papel importante en la hemostasis. En algunos procesos clínicos, la formación del coágulo produce un daño tisular irreparable, como por ejemplo en el tejido cerebral o en el miocardio. Pero la formación de fibrina también interviene en otros procesos biológicos, como la formación de nuevos vasos durante la reparación tisular o el crecimiento tumoral.

Se ha demostrado que la fibrina, al igual que otras proteínas de la matriz extracelular, promueven la formación de nuevos capilares.

La interacción de la fibrina con las células endoteliales promueve la liberación del factor von Willebrand, que posteriormente se une a las plaquetas, favoreciendo el proceso hemostático [224]. La fibrina sirve como matriz extracelular que permite a las células endoteliales migrar y formar nuevos capilares. Por tanto, dichas células endoteliales deben expresar un receptor de membrana específico para algún fragmento de la fibrina.

El proceso de formación de capilares no fue inhibido tras el empleo de anticuerpos contra diferentes integrinas como la  $\alpha_v\beta_3$ , la PECAM o contra el dominio extracelular de



la caderina N [225]. Sin embargo, un anticuerpo que reconoce los dominios 1-2 de la caderina EV sí fue capaz de detener el proceso de formación capilar.

Martínez *et al* [226] demostraron que el fragmento de la región terminal-N de la fibrina, el fragmento NDSK II, se une con gran afinidad a las células endoteliales en cultivo. Después estudiaron qué componente de las células endoteliales era capaz de unirse al NDSK II, probando varios anticuerpos que inhibieran la unión de este fragmento de la fibrina con su receptor. Solamente el anticuerpo que reconoce desde los aminoácidos 25 al 156 de la caderina EV impidió la unión del NDSK II con la caderina EV. Estos estudios identificaron una interacción novedosa entre la fibrina y una proteína de adhesión celular. Esta asociación entre el fragmento NDSK II con la caderina EV se produce por una unión heterofílica y calcio independiente, al contrario de lo que ocurre en las uniones intercelulares, que son homofílicas y calcio dependientes.

Por tanto, el dominio extracelular está implicado tanto en uniones heterofílicas como homofílicas, y esto podría ayudar a entender determinados procesos que se producen durante el crecimiento tumoral. La posibilidad de actuar únicamente sobre el dominio extracelular de la caderina EV relacionado con las uniones heterofílicas, produciría la inhibición de la neovascularización tumoral sin afectar a las uniones transcelulares homofílicas que regulan procesos fisiológicos que no deben ser alterados.

## **4. OTRAS FUNCIONES DE LA CADERINA DEL ENDOTELIO VASCULAR**

### **4.1. VASCULOGÉNESIS EMBRIONARIA**

La vasculogénesis es un proceso mediante el cual los angioblastos se diferencian *in situ* en células endoteliales que conectan y forman los vasos sanguíneos primitivos [227, 228]. Durante la embriogénesis, los angioblastos se diferencian desde el mesodermo extraembrionario situado en la vesícula vitelina, donde se forma una capa de islotes de células sanguíneas [229]. La vasculogénesis está regulada por la capacidad de las células endoteliales de adherirse unas a otras y producir estructuras vasculares. Las caderinas, como moléculas de adhesión, intervienen en este proceso, favoreciendo las



uniones homotípicas y siendo responsables del mantenimiento de esa cohesión intercelular.

La caderina EV se detecta en los primeros estadios de desarrollo vascular, tan pronto como en el séptimo día de desarrollo embrionario, en las células mesodérmicas del mesénquima del saco vitelino. En el noveno día la caderina EV se expresa en los islotes de angioblastos que formarán las células endoteliales. Al final del desarrollo embrionario, su expresión se detecta en todos los tipos de endotelio, y los niveles más bajos se sitúan en el tejido cerebral. Estrictamente se localiza en las uniones transmembrana. Según estos datos, se ha especulado que la expresión de la caderina EV y su localización puede estar asociada con la formación de las primeras estructuras vasculares [230]. Determinados estudios *in vitro* han demostrado que células pluripotenciales con un defecto en el gen de la caderina EV no son capaces de formar estructuras vasculares. Por esto se puede pensar que la presencia de esta molécula adherente es fundamental para que se inicie el proceso de vasculogénesis embrionaria y secundariamente el de morfogénesis [175, 184].

Otras proteínas de adhesión, como las integrinas y el PECAM, también se localizan en las uniones intercelulares del endotelio [231] y aunque tienen un papel en el desarrollo vascular, no son capaces de compensar la deficiencia de caderina EV en estas células mutadas. Por tanto, aquellos embriones con defectos en esta molécula transmembrana se bloquean al inicio del desarrollo embrionario.

#### 4.2. PARTICIPACIÓN DE LA CADERINA EV EN LA ANGIOGÉNESIS

La angiogénesis es un proceso biológico mediante el cual se forman nuevos capilares desde vasos preexistentes, a diferencia de la vasculogénesis que consiste en la creación de vasos sanguíneos durante el periodo embrionario. Este proceso es inducido por fenómenos inflamatorios, en el daño tisular, durante la ovulación y la menstruación, en las reacciones inmunes y es imprescindible en el crecimiento y progresión de las lesiones tumorales [232, 233].

Inicialmente se produce la degradación de la membrana basal del capilar gracias a la acción de proteasas, como por ejemplo, los miembros de la familia de las



metaloproteinasas de la matriz (MMP) [234]. Las células endoteliales migran hacia esa zona creando nuevos vasos sanguíneos desde vasos próximos ya existentes. Las moléculas de adhesión contribuyen a dicha migración favoreciendo las interacciones con la matriz extracelular de estas células endoteliales. Rabascio *et al* [235] demostraron que la cuantificación sérica de una molécula de adhesión como la caderina EV y de ARNm podía ser empleado para valorar el fenotipo angiogénico de determinados tumores malignos hematológicos, apoyando la participación directa de esta molécula en la progresión tumoral.

La angiogénesis es un proceso complejo en el cual se mantiene un balance estrecho entre las moléculas promotoras e inhibidoras:

- a) Los **promotores iniciales de la angiogénesis** son diversos factores de crecimiento como el VEGF, el factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF) y citoquinas como la IL-8 y la angiogenina [236].

El VEGF es un potente agente angiogénico y mitógeno estimulado por la hipoxia, citoquinas y varias hormonas [237]. El VEGF estimula el aumento de la permeabilidad capilar 50.000 veces más que la histamina y su presencia ha sido demostrada en las neoplasias que favorecen la ascitis tanto en animales como en humanos [238].

- b) Las **moléculas antiangiogénicas** incluyen la angiostatina (fragmento interno del plasminógeno) y las endostatina [239].

Hendrix *et al* [240] observaron que las células tumorales procedentes de melanomas eran capaces de expresar en su membrana moléculas de caderina EV. Estas células desarrollaron la capacidad de imitar a las células endoteliales y por tanto fueron capaces de formar vasos intratumorales. Aquellos tumores menos agresivos y más diferenciados que no expresaron caderina EV, no presentaron esa capacidad de inicio y mantenimiento de la angiogénesis tumoral. Se han estudiado otras proteínas transmembrana como el PECAM-1, pero no se ha encontrado una relación tan directa entre su expresión y el potencial maligno de tumor, como en el caso de la caderina EV. Esto abre nuevos caminos terapéuticos en oncología, que permitan interrumpir este desarrollo angiogénico.

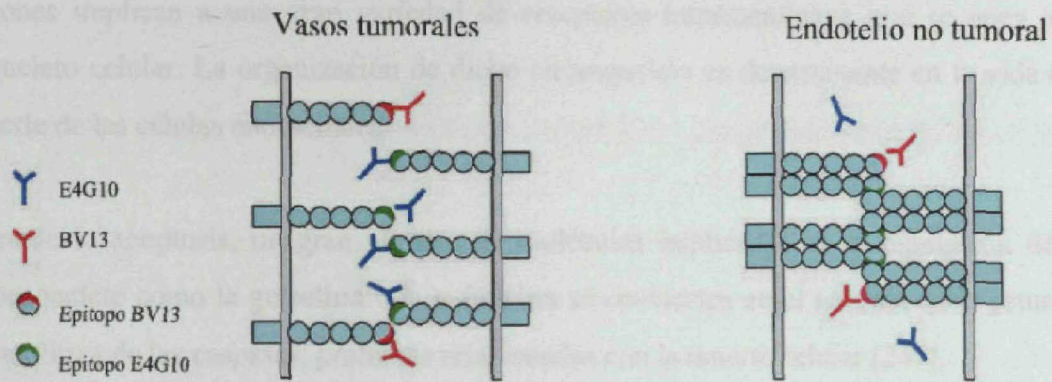


Liao *et al* [241] demostraron que el bloqueo de la caderina EV con el anticuerpo anticaderina BV13 inhibió la angiogénesis, el crecimiento tumoral y las metástasis en modelos animales de crecimiento tumoral del carcinoma de pulmón Lewis y del carcinoma epidermoide A431. Estos datos demuestran el papel necesario de la caderina EV en la angiogénesis y su característica como posible blanco de tratamiento en las terapias antiangiogénicas. El bloqueo de esta proteína transmembrana induce apoptosis en las células endoteliales y las inhabilita para el establecimiento de conexiones con el ambiente celular que las rodea. La masa tumoral no es capaz de formar vasos funcionantes, por tanto disminuye el tamaño del tumor y aumenta la necrosis. Eventos similares se han visto con el empleo de otros inhibidores de la angiogénesis como los antagonistas de receptor-2 del VEGF [242].

Es importante destacar que el anticuerpo anticaderina EV BV13 tiene una actividad tumoral muy potente *in vivo* a baja dosis. En contraste, otros anticuerpos contra el VEGF o el receptor-2 del VEGF [242] necesitan 10 veces más dosis para obtener efectos similares. El incremento en las dosis de BV13 por encima de 50  $\mu\text{g}$ /dosis produce aumento de la permeabilidad en los capilares pulmonares y edema, y en algunos casos la muerte de los animales en 24-48 horas. A dosis inferiores los anticuerpos tienen gran afinidad únicamente por la caderina EV situada en los vasos tumorales en neoformación, posiblemente por su estructura menos eficaz y por la gran actividad angiogénica de la masa tumoral.

La investigación se orientó hacia la búsqueda de anticuerpos que fueran capaces de actuar sobre la caderina EV en formación y sin afinidad por las AJ de los vasos ya formados, y así evitar los posibles efectos secundarios. Estos anticuerpos sólo reconocen epitopos de ciertas regiones de la fracción extracelular de la caderina EV que están expuestos únicamente durante el proceso de angiogénesis (figura 4). Se identificó el anticuerpo anticaderina E4G10 capaz de cumplir este requisito [243]. Se observó que los ratones toleraron bien dosis de hasta 1mg/cada 3 días durante 6 semanas. No se observó incremento en la permeabilidad a nivel cardíaco ni pulmonar, que sí fue mortal con el anticuerpo BV13.





**Figura 4.** Modelo de la unión selectiva del anticuerpo E4G10 sobre la vascularización tumoral [243].

Otro de los anticuerpos estudiados fue el BV14 [244], que inhibe la angiogénesis y reduce el tamaño tumoral, sin afectar la permeabilidad vascular. Los pulmones, el corazón y otros órganos no presentaron incremento en la permeabilidad, incluso tras dosis altas de este anticuerpo. En estudios *in vitro*, tampoco se observó incremento en la permeabilidad de la monocapa de células endoteliales, pero sí fue capaz de debilitar las uniones endoteliales más recientes e inhibir la formación de nuevas estructuras vasculares. El anticuerpo BV14 se une al dominio extracelular 4 (EC4), mientras que el anticuerpo BV13 reconoce el dominio 1 (EC1), lo que puede, en parte, explicar el comportamiento diferente de ambos anticuerpos. Las uniones estables de la caderina EV requieren la participación de varios dominios. En cambio, las uniones más recientes, son probablemente más débiles, porque en ellas se encuentran implicados menos dominios. Los hemangiomas responden a este tipo de anticuerpos, pero el glioma C6 que expresa altas concentraciones de VEGF es más sensible al anticuerpo DC101, contra el receptor VEGF-R2. Por tanto, tumores diferentes requieren distintas estrategias antiangiogénicas. Estos resultados tienen importantes implicaciones terapéuticas encaminadas hacia la búsqueda de fármacos antiangiogénicos selectivos y seguros para los pacientes.

#### 4.3. CADERINA EV Y APOPTOSIS ENDOTELIAL

La muerte celular programada o apoptosis es fundamental tanto en la homeostasis tisular como en el desarrollo de la enfermedad [245]. El anclaje de las células a la matriz extracelular a través de las integrinas [246], al igual que las uniones celulares a



través de las caderinas, juegan un papel importante en la supervivencia celular. Estas uniones implican a una gran variedad de receptores transmembrana que se unen al esqueleto celular. La organización de dicho citoesqueleto es determinante en la vida o muerte de las células endoteliales.

Durante la apoptosis, un gran número de moléculas implicadas en la regulación del citoesqueleto como la **gelsolina** o la  **$\alpha$ -fodrina** se convierten en el sustrato de la rotura proteolítica de las caspasas, proteasas relacionadas con la muerte celular [247].

Las células endoteliales que inician la apoptosis, en respuesta a la disminución de diversos factores de crecimiento, presentan inicialmente retracción celular, alteraciones en la membrana celular y pérdida de las uniones intercelulares. Estas observaciones sugieren que la alteración del citoesqueleto favorece la pérdida de las uniones celulares durante la apoptosis.

Un elemento importante implicado en las uniones interendoteliales son las AJ, en las cuales la caderina específica es la caderina EV. Ya se ha descrito que esta proteína se ancla en el citoesqueleto a través de las cateninas. Se ha demostrado que en la rotura de la  $\beta$ -catenina y la plakoglobina puede intervenir una caspasa, que podría explicar la importancia de la pérdida de estas uniones intercelulares durante la apoptosis celular [247].

La pérdida de integridad del complejo caderina EV-catenina se produce tras la unión de neutrófilos, que son capaces de activar el endotelio [248]. La desorganización de las AJ después de la activación por los neutrófilos no retrae ni daña la integridad del endotelio, ya que no se altera la estructura de la  $\alpha$ -catenina. Sí se ha comprobado que aumenta la permeabilidad vascular permitiendo el paso de células, pero parece que los mecanismos son distintos a los que se ponen en marcha durante la apoptosis celular.

Herren *et al* [249] demostraron que durante la apoptosis endotelial participan dos enzimas diferentes, una **metaloproteinasa** que rompe la porción intercelular de la caderina EV y una **caspasa** que rompe el complejo caderina EV-cateninas-plakoglobinas. La caspasa también es capaz de romper la estructura de una kinasa de adhesión focal (FAK) y esto puede interrumpir determinadas señales de supervivencia celular y activar la muerte celular programada. En estos cultivos de células, que han



iniciado la apoptosis, se aíslan fragmentos de **gelsolina**, tras la interacción con las proteasas que inician el proceso de separación y muerte celular programada.

Por tanto, las caspasas y metaloproteinasas contribuyen a la pérdida de integridad de las AJ durante el proceso de apoptosis endotelial. El inicio de la apoptosis tras la privación de factores de crecimiento se inicia con la disolución de las AJ que puede estar mediada por las metaloproteinasas que cortan el dominio extracelular de la caderina EV y por las caspasas que rompen el complejo caderina EV-catenina-plakoglobina intracelular. Tras esto se alteran las uniones con el citoesqueleto y se activa el proceso de apoptosis.

#### **4.4. IMPLICACIÓN DE LA CADERINA EV EN LAS LESIONES VASCULARES DE LA DIABETES**

Los productos de la glicosilación avanzada (PGA) están directamente relacionada con la disfunción endotelial asociada con las complicaciones micro y macrovasculares que acompañan a la diabetes y a la edad avanzada. Se sabe que los PGA producen su efecto a través de receptores celulares expresados por el endotelio. Se ha postulado que esta acción se realiza a través de alteraciones en la organización endotelial, específicamente a nivel de las AJ.

La exposición de cultivos celulares de endotelio de cordón umbilical a PGA induce una pérdida en la cantidad de caderina EV presente en la superficie celular y disminuye el contenido intracelular de caderina EV y del complejo al que se une directamente, las cateninas. No se observan cambios ni en la cantidad ni en la estructura de otras uniones intercelulares, como por ejemplo la molécula PECAM [250].

La disminución de los niveles de cateninas afecta a otras caderinas presentes en las células endoteliales, como la caderina N. Esta es una caderina clásica presente en las células endoteliales. La caderina N se une a las cateninas y a los filamentos de actina, pero en las células endoteliales compite con la caderina EV, por tanto se piensa que está presente en la membrana celular, pero no interviene directamente en las uniones celulares. Parece que podría promover las uniones con otros tipos celulares presentes en los vasos sanguíneos.



Se ha demostrado que la unión de los PGA con el receptor celular genera agentes oxidantes que lesionan la estructura celular. La aportación de antioxidantes como la N-acetil-cisteína o la pirolidina ditiocarbamato previene el descenso de caderina VE [251].

Se han descrito cuatro receptores celulares para los PGA:

1. El complejo de oligosacaridos transferasa-48 (AGE-R1).
2. La fosfoproteína 80K-H (AGE-R2).
3. La galectina-3 (AGE-R3).
4. El receptor para los PGA (RAGE).

Este último es el mejor caracterizado de los cuatro. Es un receptor multi-ligando que pertenece a la familia de las inmunoglobulinas. La interacción de los PGA con el RAGE acelera el estrés oxidativo intracelular y altera diferentes funciones celulares. Esta interacción incrementa la permeabilidad e interviene en el desarrollo de la vasculopatía diabética. Se desconoce el mecanismo molecular exacto responsable de la disrupción de la caderina EV en las células endoteliales, pero es esta alteración la responsable del aumento en la permeabilidad vascular.

Davidson *et al* [252] demostraron la pérdida de complejos caderina EV en pacientes diabéticos con retinopatía diabética. Se observó que la presencia constante de PGA en los capilares de la retina produce aumento de la permeabilidad y de la migración celular. Esto mismo se ha podido observar en las complicaciones retinianas que padecen pacientes de edad avanzada y podría explicar la neuropatía, la nefropatía y la enfermedad macrovascular que padecen los enfermos diabéticos. Cada vez mas trabajos recientes relacionan las alteraciones en la caderina EV con procesos degenerativos vasculares como la aterosclerosis coronaria [253, 254] y se ha demostrado que determinados tratamiento como la terapia hormonal sustitutiva o el raloxifeno pueden disminuir la alteración de la caderina EV y secundariamente retrasar el progreso de la lesión ateromatosa [255].

Como se ha comentado previamente, el VEGF es capaz de inducir también el aumento en la permeabilidad y favorecer la angiogénesis a través de la fosforilación de los



residuos tirosina de la caderina EV. El VEGF realiza esta acción sin afectar a la cantidad ni a la expresión de caderina EV sobre la membrana celular. Por tanto, parece que el efecto producido por los PGA está mediado por un mecanismo distinto al VEGF, ya que sí afecta a la cantidad de caderina EV presente en la superficie celular.

#### 4.4.1. Diabetes gestacional y caderina EV

Babawale *et al* [256] y Leach *et al* [257] describieron una reducción en la concentración de proteínas transmembrana en los vasos placentarios procedentes de pacientes diagnosticadas de diabetes gestacional y diabetes tipo 1. Estudiaron mediante inmunofluorescencia la cantidad de caderina EV, catenina- $\beta$ , ocludina y ZO-1 y observaron una señal menor en los vasos de las placentas de dichas pacientes. Estos resultados sugieren que aunque el insulto diabético sea durante un corto espacio de tiempo, se altera la expresión de las proteínas transmembrana endoteliales. Estos cambios traducen un fallo en el funcionamiento de la barrera transplacentaria.

Cambios similares fueron observados por Wang *et al* [258, 259] cuando estudiaron la distribución de la caderina EV en el endotelio de venas umbilicales procedentes de pacientes diagnosticadas de preeclampsia. Se observó desorganización de las AJ con una expresión menor de la caderina EV en la membrana celular. En el tercer pase de los cultivos HUVEC se restablecieron los contactos intercelulares y la expresión de la caderina EV fue comparable a los controles.

Estos datos apoyan la importancia de la barrera endotelial en la fisiopatología de la diabetes gestacional y la preeclampsia y abren nuevas vías de investigación basadas en los aspectos moleculares y celulares dañados en ambas patologías.



### OBJETIVOS/HIPÓTESIS DE TRABAJO



El síndrome de hiperestimulación ovárica se caracteriza por un aumento en la permeabilidad capilar, lo que favorece la formación de ascitis y el derrame pleural.

Se ha demostrado un incremento significativo en las concentraciones plasmáticas y en el líquido folicular de VEGF, después de la administración de hCG, en las pacientes con riesgo aumentado de desarrollar un SHO.

Una de las proteínas implicadas en la unión intercelular del endotelio vascular es la caderina EV. El VEGF afecta a la permeabilidad vascular *in vitro* e *in vivo* porque induce la fosforilación en los residuos tirosina del complejo de la caderina EV en las células del endotelio vascular [167, 260]. A partir de estos datos desarrollamos nuestra hipótesis de trabajo, que consiste en comprobar que:

La modificación de la caderina EV, a través de la acción directa de VEGF, podría ser la responsable del aumento de la permeabilidad celular endotelial y, por tanto, justificar la clínica de ascitis y derrame pleural observada en pacientes que padecen el SHO.

Para comprobar esta hipótesis se realizaron los siguientes experimentos:

### **EXPERIMENTOS IN VITRO**

#### **1. Comprobar como los factores implicados en el SHO modifican la liberación de la fracción soluble de la caderina EV**

Para ello llevamos a cabo, sobre cultivos en monocapa de HUVEC, diferentes tratamientos con  $E_2$ , hCG, VEGF y anti-VEGF.

Además, intentamos definir el inicio y la duración del efecto del VEGF sobre la secreción de caderina EV, manteniendo una dosis fija de VEGF (aquella que ha producido mayor secreción de caderina EV en los experimentos anteriores).

#### **2. Demostrar que el incremento en la liberación de la fracción soluble de caderina EV no es producido por la lisis o por la proliferación celular del cultivo HUVEC**



**3. Estudiar los cambios que el VEGF induce en el citoesqueleto de las células HUVEC, que pueden explicar el aumento de la permeabilidad endotelial**

Para ello se analizaron los cambios morfológicos originados por la reorganización de los filamentos de actina tras los diferentes estímulos, mediante el microscopio de fluorescencia.

**4. Cuantificar la permeabilidad de la monocapa HUVEC**

Mediante la medición de la cantidad de albúmina marcada con isotiocianato fluorescente (albúmina-FITC) que atravesó la monocapa HUVEC sometida a diferentes concentraciones de VEGF y anti-VEGF.

**EXPERIMENTOS *IN VIVO***

**Medir los niveles séricos de la fracción soluble de la caderina EV en pacientes sometidas a estimulación ovárica para ciclos de fecundación *in vitro* y evaluar su correlación con el SHO temprano y tardío.**

Estas determinaciones se realizaron en diferentes momentos tras la estimulación ovárica, comparando a las pacientes que desarrollaron el SHO temprano con un grupo control de pacientes sometidas al mismo tratamiento de estimulación, pero que no presentaron ni síntomas ni signos del SHO temprano.

En las pacientes que desarrollaron el SHO temprano y que consiguieron la gestación, se midió semanalmente la concentración sérica de la caderina EV en aquellas que desarrollaron síntomas y signos compatibles con el SHO tardío. En el grupo control se incluyó a pacientes gestantes tras un ciclo de donación de ovocitos, por tanto sin estimulación ovárica previa. En ambos grupos, el seguimiento clínico y las determinaciones séricas de la caderina EV se realizaron hasta que se confirmó el latido embrionario positivo.



## MATERIALES Y MÉTODOS

## MATERIALES Y MÉTODOS



## 1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para estudiar la relación entre la caderina EV y el SHO se diseñó un trabajo experimental dividido en dos partes:

- **Experimentos *in vitro*** desarrollados sobre cultivos celulares sometidos a los mismos estímulos que las pacientes con SHO.
- **Experimentos *in vivo*** basados en el seguimiento y valoración de los cambios en la liberación sérica de la fracción soluble de la caderina EV en las pacientes que desarrollaron el SHO temprano y tardío, durante el tratamiento médico para una fecundación *in vitro*.

Primero se llevaron a cabo los experimentos *in vitro* con cultivos celulares primarios derivados de células del endotelio vascular de cordón umbilical humano (*human umbilical vein endothelial cells* - HUVEC).

Para ello se desarrolló el protocolo de laboratorio que permitió realizar el aislamiento celular a partir de los cordones umbilicales y el mantenimiento de los cultivos. Los cordones umbilicales fueron donados por pacientes sometidas a la intervención de cesárea en el Hospital Universitario La Paz. La indicación de cesárea en todos los casos fue por presentación podálica o por no progresión de parto y se excluyeron las pacientes que desarrollaron diabetes gestacional y preeclampsia y aquellas con rotura prematura de membranas mayor de 12 horas. Posteriormente, se realizaron los experimentos de los diferentes estímulos y el bloqueo de la liberación de la caderina EV por los cultivos HUVEC y los cambios en la permeabilidad endotelial.

En segundo lugar, se diseñó un estudio clínico, prospectivo y de cohortes. Para ello, se incluyeron 62 pacientes que acudieron al Instituto Valenciano de Infertilidad para la realización de un tratamiento de fecundación *in vitro*. Todas las pacientes fueron sometidas a una estimulación ovárica con gonadotropinas, según protocolos habituales. Después de la punción folicular, se realizó el seguimiento clínico para valorar el desarrollo de síntomas y signos del **síndrome de hiperestimulación**



**ovárica temprano**, que permitió clasificar a las pacientes en el grupo de estudio o en el grupo control.

Tras la determinación sérica de la  $\beta$ -hCG en sangre como prueba de embarazo, aquellas pacientes que consiguieron la gestación fueron valoradas clínicamente para determinar el desarrollo del **síndrome de hiperestimulación tardío**, y se incluyeron en el segundo grupo de estudio. En esta segunda parte, como grupo control se seleccionó a pacientes gestantes tras un ciclo de donación de ovocitos, ya que son pacientes que no han sido estimuladas con gonadotropinas y no han recibido hCG exógena, tan sólo la hCG producida por el sincitiotrofoblasto.

La memoria del proyecto de investigación fue aprobada por el comité ético y científico del Instituto Valenciano de Infertilidad y el consentimiento informado se obtuvo firmado por todas las participantes en el estudio (Apéndice).

## 2. PRODUCTOS QUÍMICOS EMPLEADOS

Los reactivos de laboratorio, empleados para este trabajo, fueron adquiridos a diferentes laboratorios farmacéuticos y se detallan en la tabla II.

**Tabla II.** Reactivos empleados.

PRODUCTOS	LABORATORIOS
Colagenasa tipo IA	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Alemania)
Tripsina - EDTA	Gibco Invitrogen Co. (Paisley, Escocia, UK)
17- $\beta$ estradiol	Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO)
hCG	hCG-Lepori 2500 UI, Farma-Lepori (Barcelona)
VEGF humano recombinante	R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN)
Anticuerpo anti-VEGF	R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN)
Azul de Tripan	Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO)
Kit I MTT	Roche Diagnostics Co. (Indianapolis, IN).
Albumina - FITC	Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO)
Faloidina - TRITC	Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO)



### 3. AISLAMIENTO DE LAS CÉLULAS Y TÉCNICA DEL CULTIVO CELULAR

Las venas de los cordones umbilicales fueron sometidas a cuatro lavados con medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) con 4.5 gr/L de glucosa y sin L-Glutamina (Cambrex Bio Science Verviers, Bélgica) para arrastrar los restos sanguíneos. Posteriormente, se cateterizaron las venas umbilicales, y tras pinzar los dos extremos de los cordones, se rellenó el calibre venoso con colagenasa tipo IA y medio DMEM (vol / vol 1:10). Los cordones se mantuvieron 10 minutos a 37 °C, en una atmósfera humidificada con un 5% de CO<sub>2</sub>. Pasado este tiempo, se despinzó un extremo y se recogió el medio acumulado en el calibre venoso. Este medio fue centrifugado a 2000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante fue eliminado y las células aisladas fueron resuspendidas en un 1 mL de medio de crecimiento endotelial: EMB CC3121 + EGM<sup>TM</sup>-2 SingleQuots® CC-4176 (Clonetics®, Cambrex Bio Science Walkersville Inc., Walkersville, MD), que contiene suero bovino fetal (2%), heparina (0.1%), factor-B de crecimiento de fibroblastos humano (0.4%), IGF (2%), factor de crecimiento endotelial (2%), hidrocortisona (0.04%), sulfato de gentamicina y anfotericina B (2%).

La viabilidad celular fue superior al 95% comprobada mediante la tinción con Azul de Tripan y fueron sembradas sobre placas de 6 pocillos, con una densidad de 15000-20000 células / cm<sup>2</sup> (comprobado mediante cámara de Neubauer). Los cultivos se mantuvieron a 37 °C, en una atmósfera humidificada con un 5% de CO<sub>2</sub>, y se esperó a que la monocapa fuera completa. Posteriormente las células en monocapa se pasaron por métodos estándar de tripsinización (Tripsina-EDTA con medio DMEM vol / vol 1:10) a placas de 12 pocillos y fueron cultivadas con medio EMB + EGM. De nuevo se esperó a tener una monocapa confluyente para realizar los experimentos. Las células endoteliales fueron comprobadas morfológicamente todos los días en un microscopio óptico invertido (Nikon Eclipse T5100).



#### 4. EXPERIMENTOS DOSIS - RESPUESTA Y DE CINÉTICA TEMPORAL PARA CUANTIFICAR LA FRACCIÓN SOLUBLE DE LA CADERINA EV

Primero se realizaron los **experimentos dosis - respuesta**, añadiendo diferentes concentraciones de:

a) **17- $\beta$  estradiol**: (0,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  mol/L de  $E_2$ , reconstituido en alcohol y diluido en medio de cultivo EMB + EGM) sobre el cultivo endotelial en monocapa. Tras 24 horas de incubación a 37 °C y 5% de  $CO_2$ , se recogió el medio condicionado. Este medio fue centrifugado brevemente a 4 °C, para eliminar las células, y almacenado a -80 °C, hasta ser determinada la fracción soluble de la caderina EV mediante un kit de ELISA disponible comercialmente. Se realizaron un total de tres experimentos.

b) **hCG**: El segundo punto estudiado fue el efecto de dosis crecientes de hCG durante 24 horas. Un rango de concentraciones de hCG desde 0 hasta 1000 UI/mL (0, 1, 100, 1000 UI/mL) fueron añadidas, considerando que entre 100 y 200 UI/mL se encuentra la dosis máxima encontrada *in vivo* después de 24 horas [261]. De nuevo el medio condicionado fue recogido y almacenado. Se realizaron un total de tres experimentos.

c) **VEGF**: Posteriormente, se estudió el efecto de dosis crecientes de VEGF (0, 10, 100, 1000 pg/mL) sobre el cultivo HUVEC en monocapa. Se realizaron un total de tres experimentos.

d) **hCG + VEGF**: También se comprobó si existe **incremento aditivo** en la secreción de caderina EV tras la adición de 1000 UI de hCG a las diferentes concentraciones de VEGF.

e) **anti-VEGF + VEGF**: Por último, se valoró si la secreción de caderina EV es inhibida añadiendo anticuerpos anti-VEGF a la monocapa celular estimulada con 10 pg/mL de VEGF. Las dosis de anti-VEGF empleadas fueron 0, 75, 150 y 300 pg/mL. Se realizaron un total de tres experimentos.



En segundo lugar, se realizaron los **experimentos de cinética temporal** para definir el inicio y la duración del efecto del VEGF sobre la secreción de caderina EV. Para ello se estimularon los cultivos en monocapa de células endoteliales con dosis fijas VEGF (100 pg/mL) y se compararon con un control. El medio condicionado fue recogido a los **10 minutos, 3, 6, 12, 24 y 48 horas** del estímulo con VEGF y almacenado en las mismas condiciones descritas previamente. Se realizaron un total de tres experimentos.

## 5. COMPROBACIÓN DE LA VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN CELULAR

La viabilidad celular se comprobó con un colorante vital (Azul de Tripán) y la proliferación celular se determinó mediante un ensayo colorimétrico con MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-dipeniltetrazolium bromide), con el objetivo de comprobar que el incremento en la secreción de caderina EV no era debido a la lisis o muerte celular o a la proliferación celular.

El Azul de Tripán es un coloide que se introduce en el interior de las células que presentan roturas en la membrana. Así pues las células que aparecen teñidas, claramente de color azul, son consideradas no viables. Una vez finalizados los experimentos comentados en el punto nº 4, se extrajo el medio de cultivo y los cultivos endoteliales en monocapa fueron lavados tres veces con PBS. Posteriormente se tiñeron con el colorante vital Azul de Tripán y se realizó un último lavado con PBS para eliminar el colorante sobrante. La lisis celular se comprobó con el microscopio óptico invertido (Nikon Eclipse T5100).

El ensayo colorimétrico MTT, descrito por primera vez por Mosmann en 1983, se emplea para cuantificar de una forma no radioactiva la proliferación celular. Este experimento está basado en la habilidad de la enzima mitocondrial deshidrogenasa de las células vivas para romper el anillo tetrazolium del MTT y formar cristales púrpura. Estos cristales son impermeables a las membranas celulares y se acumulan entre las células vivas. Estos cristales se solubilizan mediante una sustancia detergente y el número de células supervivientes es directamente proporcional a la cantidad de cristales púrpura formados. El color puede ser cuantificado mediante un



simple experimento colorimétrico. Los resultados pueden ser leídos mediante espectrofotometría en un lector de placas de ELISA. La longitud de onda para medir la absorbancia de los cristales púrpura debe ser entre 550 y 600 nm, de acuerdo a los filtros disponibles para el lector de ELISA empleado.

Tras finalizar los experimentos, se añadieron 50 µL de reactivo MTT a cada pocillo. Después de un período de incubación de 4 horas en una atmósfera humidificada, a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>, se añadieron 500 µL de una solución disolvente a cada pocillo y las placas permanecieron toda la noche en el incubador. Tras comprobar la disolución completa de los cristales púrpura, se cuantificó la absorbancia espectrofotométrica de las muestras empleando un lector de placas del ELISA, a una longitud de onda de 570 nm.

Por tanto, un incremento en el número de células vivas produce a su vez un aumento en la actividad metabólica de la muestra. Este aumento se relaciona directamente con la cantidad de cristales púrpura formados, y la intensidad óptica del color puede ser cuantificada mediante el estudio de la absorbancia.

## 6. CAMBIOS DE LA MORFOLOGÍA CELULAR INDUCIDOS POR LOS ESTÍMULOS

Las células HUVEC fueron cultivadas en placas de 6 pocillos sobre cubreobjetos, esperando hasta alcanzar la monocapa completa:

a) Se incubaron durante 24 horas sometidas a varios estímulos: E<sub>2</sub> (10<sup>-5</sup> mol/L), hCG (1000 UI), VEGF (10 y 100 pg/mL), hCG (1000 UI) + VEGF (100 pg/mL) y por último, VEGF (10 pg/mL) + anti-VEGF (150 pg/mL).

b) En una segunda fase se estimularon los cultivos endoteliales con 100 pg/mL de VEGF y se observaron los cambios en la morfología celular a lo largo del tiempo, estudiando el cultivo celular a los 10 minutos del estímulo, 3, 6, 12 y 24 horas.

Después de estos tratamientos, las monocapas celulares fueron lavadas tres veces con PBS y fijadas con paraformaldehído al 0,5% en PBS, a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente se lavaron tres veces más con PBS y se mantuvieron durante 8 minutos en una solución con Tritón X-100 (Boehringer



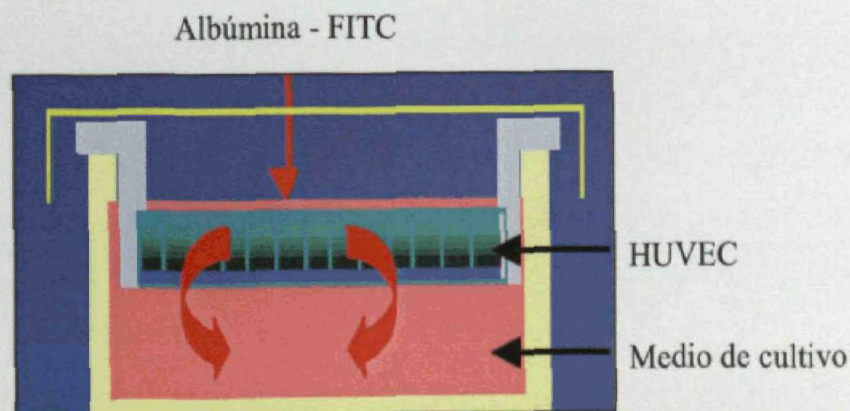
Mannheim, Mannheim, Alemania) en PBS, a temperatura ambiente, para permeabilizar la membrana celular. En el último paso se lavaron cuatro veces con PBS y se añadieron 40  $\mu\text{L}$  de **faloidina-TRITC** (isotiocianato tetrametilrodamina) (concentración final 20 mg/mL) a cada cubreobjetos durante 45 minutos, preservando los cultivos de la luz ambiental. La faloidina se une a los filamentos de actina del citoplasma, quedando así la actina marcada con TRITC.

Mediante el análisis con microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E400) se observó la disposición de los filamentos de actina tras los diferentes estímulos, comparándolos frente a una monocapa celular control cultivada en condiciones basales.

## 7. EXPERIMENTOS DE PERMEABILIDAD FUNCIONAL

Por último, se analizó la permeabilidad funcional de la monocapa celular. Para ello se realizó la medición del paso de albúmina marcada con isotiocianato fluorescente (**albúmina - FITC**) a través de la monocapa endotelial sometida a varios estímulos.

Las monocapas HUVEC fue sembradas sobre **filtros Transwell** (Figura 5) (Costar, Cambridge, MA) en placas de 24 pocillos, con una superficie plástica porosa (diámetro de los poros de 5  $\mu\text{m}$ ) y cultivadas con 400  $\mu\text{L}$  de medio EGM + EBM en la cámara superior y 1200  $\mu\text{L}$  del mismo medio en la cámara inferior. Las monocapas se desarrollaron durante tres días sin cambiar el medio de cultivo, hasta que alcanzaron la confluencia.



**Figura 5.** Esquema del filtro *Transwell* con el cultivo en monocapa HUVEC.



Para los experimentos se añadieron 5  $\mu$ L de albúmina – FITC (concentración final 2 mg/mL) en la parte superior de todos los pocillos e inmediatamente después cada uno de los cultivos fue sometido al estímulo del **VEGF** (10 y 100 pg/mL) y **VEGF** (10 pg/mL) + **anticuerpo anti-VEGF** (150 pg/mL) y **VEGF** (100 pg/mL) + **anticuerpo anti-VEGF** (150 pg/mL) y fueron comparados frente a un cultivo HUVEC control.

Tras la incubación de las monocapas en una atmósfera humidificada, a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>, se recogieron muestras de 50  $\mu$ L de medio condicionado del compartimento inferior de los pocillos, a las **2, 4, 6, 12 y 24 horas**. En cada uno de los momentos, tras la recogida de las muestras, se añadieron 50  $\mu$ L de medio de cultivo EGM + EBM en el compartimento inferior, para mantener el equilibrio hidrostático entre ambas cámaras. El medio condicionado fue congelado y almacenado a –80 °C.

El medio congelado en Eppendorf de cada una de las condiciones de cultivo fue descongelado. Tras la descongelación, cada muestra se colocó en un pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo plano (Nunc®, Wiesbaden, Alemania). El contenido fluorescente de cada una de las muestras fue medido mediante espectrofotofluorometría (SPECTRAFluor Plus; 94390; Firmware: V 4.23 – 09/98; XFLUOR Versión: V 3.21; TECAN). La longitud de onda empleada fue de 488 nm, y la medida se realizó por triplicado, tomándose el valor medio obtenido. Mediante este método se determinó la cantidad de albúmina marcada que atravesó la monocapa en respuesta a los diferentes estímulos.



## 8. SÍNDROME DE HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA TEMPRANO

### 8.1. Protocolos de estimulación e inducción de la ovulación

El tratamiento médico para la estimulación e inducción de la ovulación se realizó siguiendo dos de los protocolos habituales empleados para la FIV en el Instituto Valenciano de Infertilidad. La descripción de ambos tratamientos se detalla a continuación:

#### - **Protocolo largo de estimulación con agonistas de la GnRH.**

La triptorelina subcutánea (Decapeptyl diario 0,1 mg; Laboratorios Ipsen Pharma, Barcelona), a dosis de 0,1 mg/día, se inició en la mitad de la fase lútea del ciclo previo a la estimulación ovárica. Cuando la supresión hipofisaria fue demostrada (niveles séricos de estradiol  $< 30$  pg/mL [100 pmol/L]) y el reposo ovárico fue comprobado por ecografía (ningún folículo con diámetro mayor de 10 mm), se disminuyó la dosis de triptorelina a 0,05 mg/día y se añadieron 150 UI de folitropina alfa (Gonal-f 75 UI; Laboratorios Serono, Madrid) y 75 UI de menopina (Menopur; Laboratorios Ferring, Madrid). La monitorización del desarrollo folicular se realizó mediante ecografías transvaginales seriadas y la determinación de los niveles séricos de estradiol. Las dosis de folitropina alfa y menopina fueron ajustadas tras 5 días de estimulación, de acuerdo a la respuesta folicular observada en cada paciente y los niveles de estradiol sérico comprobados el tercer día de la estimulación. Treinta y seis horas antes de la punción folicular se administraron 10.000 UI de hCG (hCG-Lepori 2500 UI; Laboratorios Farma-Lepori, Barcelona). El soporte de la fase lútea se realizó con progesterona natural micronizada vía vaginal, 400 mg/día (Progeffik 200; Laboratorios Effik, Madrid). Ninguna paciente recibió progesterona intramuscular ni hCG como soporte de la fase lútea.

#### - **Protocolo de estimulación con antagonistas de la GnRH.**

El segundo día del ciclo (contando como primer día el inicio de la menstruación) se realizó la ecografía transvaginal y la determinación de estradiol sérico para comprobar el reposo ovárico (nivel de estradiol  $< 30$  pg/mL [100 pmol/L]). Se inició la estimulación ovárica controlada con 150 UI de folitropina



alfa (Gonal-f 75 UI; Laboratorios Serono, Madrid) y 75 UI de menopina (Menopur; Laboratorios Ferring, Madrid). Las dosis de folitropina alfa y menopina fueron ajustadas tras 4 días de estimulación, de acuerdo a la respuesta folicular observada en cada paciente y los niveles de estradiol sérico comprobados el tercer día de la estimulación. Cuando al menos un folículo alcanzó un diámetro medio de 14 mm se inicio la administración del antagonista de la GnRH, ganirelix 0,25 mg/día (Orgalutran, Laboratorios Organon Española, Barcelona). Treinta y seis días horas antes de la punción folicular se administraron 10.000 UI de hCG (hCG-Lepori 2500 UI; Laboratorios Farma-Lepori, Barcelona). El soporte de la fase lútea se realizó con progesterona natural micronizada vía vaginal, 400 mg/día (Progeffik 200; Laboratorios Effik, Madrid). Ninguna paciente recibió progesterona intramuscular ni hCG como soporte de la fase lútea.

Tanto las pacientes del grupo de estudio como las pacientes del grupo control fueron sometidas a la punción folicular, bajo sedación, para la captación ovocitaria. La transferencia embrionaria se realizó el tercer día de desarrollo embrionario. Ninguna paciente fue cancelada por el riesgo de hiperestimulación, ni sus embriones fueron criopreservados.

## 8.2. Selección de las pacientes participantes

Las pacientes sometidas a estimulación ovárica, con uno de los dos tratamientos anteriormente descritos, fueron clasificadas en dos grupos atendiendo a los tres **criterios de inclusión** que se detallan a continuación:

- Tamaño ovárico mayor de 5 cm.
- Ascitis con o sin derrame pleural.
- Evidencia analítica de hemoconcentración, demostrada por el aumento del hematocrito por encima del 45% o por leucocitosis superior a 15000 leucocitos/mm<sup>3</sup>.

En el **grupo de estudio** se incluyeron 28 pacientes, sin antecedentes médicos de interés, que desarrollaron síntomas y signos de **SHO temprano grave**, de acuerdo con el sistema de clasificación de Golan *et al* [62] (tabla I). Todas ellas presentaron niveles séricos de E<sub>2</sub> iguales o superiores a 3500 pg/mL, el día de la administración de la hCG y cumplieron los tres criterios de inclusión.



**Tabla I.** Clasificación clínica de Golan *et al* [62] para el síndrome de hiperestimulación ovárica.

Leve	Estradiol sérico elevado Ovarios menores de 5 cm
Moderado	Distensión abdominal Náuseas, vómitos o diarrea Tamaño ovárico entre 5-12 cm
Grave	Ascitis (hidrotórax / derrame pericárdico) Disfunción renal Oliguria menor de 600 ml/24 horas Niveles de creatinina 1.0-1.5 mg/dL Aclaramiento de creatinina > 50 ml/min Hematocrito > 45% Leucocitosis > 15000
Crítico	Ascitis a tensión con hidrotórax y derrame pericárdico Hematocrito > 55% Leucocitosis > 25000 Disfunción renal grave Oligoanuria Niveles de creatinina > 1.6 mg/dL Aclaramiento de creatinina < 50 ml/min Distrés respiratorio del adulto Fenómenos tromboembólicos

Algunas pacientes presentaron síntomas gastrointestinales como diarrea y vómitos. Las manifestaciones clínicas presentadas por las pacientes incluidas en el grupo de estudio se muestran en la tabla III.

**Tabla III.** Manifestaciones clínicas del SHO grave

Variable	Valor
Tamaño ovárico medio (mm)	67.2 ± 3.5
Ascitis	28 (100)
Derrame pleural	5 (17.9)
Hematocrito (%)	47.7 ± 1.2
Leucocitos (células/mm <sup>3</sup> )	17050 ± 550
Nivel E <sub>2</sub> (pg/mL)	3747 ± 315.3
Síntomas gastrointestinales	10 (35.7)

Nota: Los valores se presentan como media ± error estándar de la media ó n° (%)



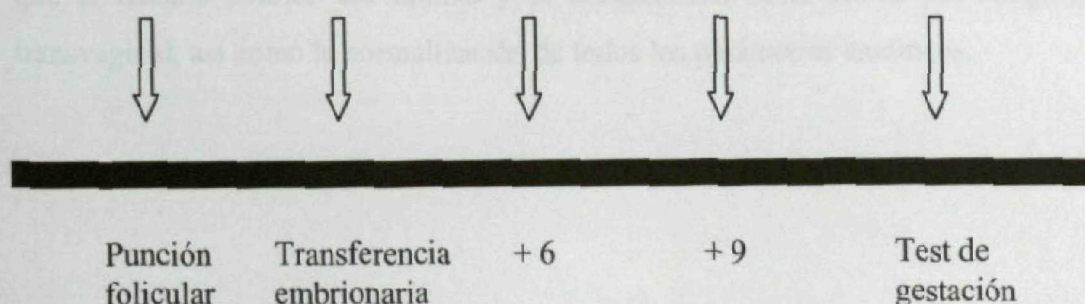
En el **grupo control** se incluyeron 34 pacientes, sin antecedentes médicos de importancia. Estas pacientes fueron sometidas a un ciclo de estimulación ovárica para FIV y no desarrollaron ningún síntoma, ni se observaron valores analíticos compatibles con el síndrome de hiperestimulación ovárica temprano.

Todas ellas presentaron niveles séricos de  $E_2$  inferiores a 3500 pg/mL el día de la administración de la hCG.

La distribución de los dos protocolos de estimulación e inducción de la ovulación, tanto en el grupo estudio como en el grupo control, no resultó heterogénea ( $p = 0.386$ ).

### 8.3. Cronología de los controles

Para el seguimiento del síndrome de hiperestimulación temprano se realizaron 5 controles mediante ecografía transvaginal y las extracciones de las muestras de sangre por venopunción en el antebrazo (figura 6). Los controles se realizaron el día de la captación ovocitaria (tomando este control como basal), el día de la transferencia embrionaria (todas las transferencias se realizaron en el día +3 de desarrollo embrionario), dos controles más el día + 6 y + 9 tras la punción folicular y un último control el día del test de gestación en sangre, que coincide con el día + 12 tras la transferencia embrionaria. La prueba de embarazo se realizó mediante la determinación de  $\beta$ -hCG en sangre. En la ecografía se determinó el tamaño de los ovarios y la existencia o no de ascitis.



**Figura 6.** Cronología de los controles

Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 1000 x g durante 10 minutos y el suero fue almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta que se determinó la fracción soluble de la caderina EV.



#### 8.4. Seguimiento de las pacientes diagnosticadas de SHO temprano

Las 28 pacientes hiperestimuladas fueron ingresadas en el hospital de día y en algunas ocasiones se realizó un seguimiento ambulatorio diario.

Fueron tratadas con soluciones coloides y cristaloides intravenosas. Las soluciones coloides empleadas fueron el hidroxietilalmidón (PM 200.000/0,6) al 6% en solución isotónica de cloruro sódico (ELOHES<sup>®</sup>, Fresenius Kabi España, S.A., Barcelona) y la Albúmina Humana al 20% (Instituto Grifols S.A., Barcelona). Como solución cristaloides se empleó la solución isotónica de cloruro sódico al 0,9% (B Braun Medical S.A., Barcelona). Los tratamientos intravenosos se administraron según las variables hemodinámicas y la medición de la orina recogida durante 24 horas.

Se realizaron hemogramas y pruebas de coagulación, control de los electrolitos séricos y de la función hepática y renal. El tamaño de los ovarios y la cantidad de ascitis se calcularon con ecografía transvaginal y abdominal. El derrame pleural se valoró por la exploración física.

Ninguna paciente requirió ingreso en una unidad de cuidados intensivos y en tres de ellas fue precisa la realización de paracentesis evacuadora, debido a la distensión abdominal y al deterioro de su estatus respiratorio. El seguimiento clínico se realizó hasta la recuperación total de las pacientes. Para ello, fue imprescindible comprobar que el tamaño ovárico era normal y la desaparición de la ascitis por ecografía transvaginal, así como la normalización de todos los parámetros analíticos.



## 9. SÍNDROME DE HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA TARDÍO

### 9.1. Selección de las pacientes participantes

En la segunda parte del estudio clínico se continuó con el **control semanal** de las 10 pacientes con SHO temprano que consiguieron gestación. El objetivo fue diagnosticar cuales desarrollaron síntomas y signos de SHO tardío.

Los **criterios de inclusión** fueron los mismos que para el síndrome de hiperestimulación temprano:

- Tamaño ovárico mayor de 5 cm.
- Ascitis con o sin derrame pleural.
- Evidencia analítica de hemoconcentración, demostrada por el aumento del hematocrito por encima del 45% o por leucocitosis superior a 15000 leucocitos/mm<sup>3</sup>.

En este segundo **grupo de estudio** se incluyeron 8 pacientes que cumplían los tres criterios de inclusión, es decir, la clínica de hiperestimulación se mantuvo o empeoró tras el diagnóstico de la gestación.

Las manifestaciones clínicas presentadas por las pacientes incluidas en el grupo de estudio se muestran en la tabla IV.

**Tabla IV.** Manifestaciones clínicas del SHO tardío.

Variable	Valor
Tamaño ovárico medio (mm)	74.2 ± 1.7
Ascitis	8 (100)
Derrame pleural	4 (50)
Hematocrito (%)	49.3 ± 2.1
Leucocitos (células/mm <sup>3</sup> )	19500 ± 550
Nivel E <sub>2</sub> (pg/mL)	3935 ± 256
Síntomas gastrointestinales	1 (12.5)

Nota: Los valores se presentan como media ± error estándar de la media ó n° (%).



En el **grupo control** se incluyeron 6 pacientes, sin antecedentes médicos de interés, que gestaron tras un ciclo de donación de ovocitos.

Estas pacientes no desarrollaron ningún síntoma relacionado con el SHO temprano durante la preparación endometrial, ni con el SHO tardío tras la consecución de la gestación.

### 9.2. Protocolo de preparación endometrial en la donación de ovocitos

En las pacientes incluidas en el programa de donación de ovocitos se aplicó triptorelina intramuscular, una dosis única de depósito de 3,75 mg (Decapeptyl 3,75 MG; Laboratorios Ipsen Pharma, Barcelona) en la mitad de la fase lútea del ciclo previo a la donación ovocitaria. Con esta dosis se consiguió la desensibilización hipofisaria durante un mes.

La preparación endometrial se realizó mediante terapia hormonal sustitutiva, 6 mg/día de valerianato de estradiol (Progynova; Laboratorios Cicsa Shering, Madrid) vía oral, durante 15 días. Posteriormente, se comprobó el grosor y morfología endometrial mediante ecografía transvaginal (grosor medio:  $8,5 \pm 0,2$  mm, con endometrio trilaminar), y se determinó la concentración sérica de 17- $\beta$  estradiol ( $171 \pm 15$  pg/mL). Se completó la terapia con 800 mg/día de progesterona natural micronizada vía vaginal (Progeffik 200; Laboratorios Effik, Madrid), realizando la transferencia embrionaria al tercer día del inicio de la progesterona vaginal.

### 9.3. Cronología de los controles

Para el seguimiento del síndrome de hiperestimulación tardío se realizaron 3 controles semanales posteriores a la determinación de  $\beta$ -hCG en sangre, mediante ecografía y extracciones de muestras de sangre, cumpliendo las condiciones anteriormente mencionadas. En las ecografías, al mismo tiempo de medir el tamaño de los ovarios y observar la existencia o no de ascitis, se comprobó la implantación intrauterina del saco gestacional y el número de sacos implantados. En el último control ecográfico se comprobó la existencia de latido embrionario.



## 10. ENSAYO DE INMUNOABSORBANCIA LIGADO A ENZIMA (ELISA) PARA LA FRACCIÓN SOLUBLE DE LA CADERINA EV

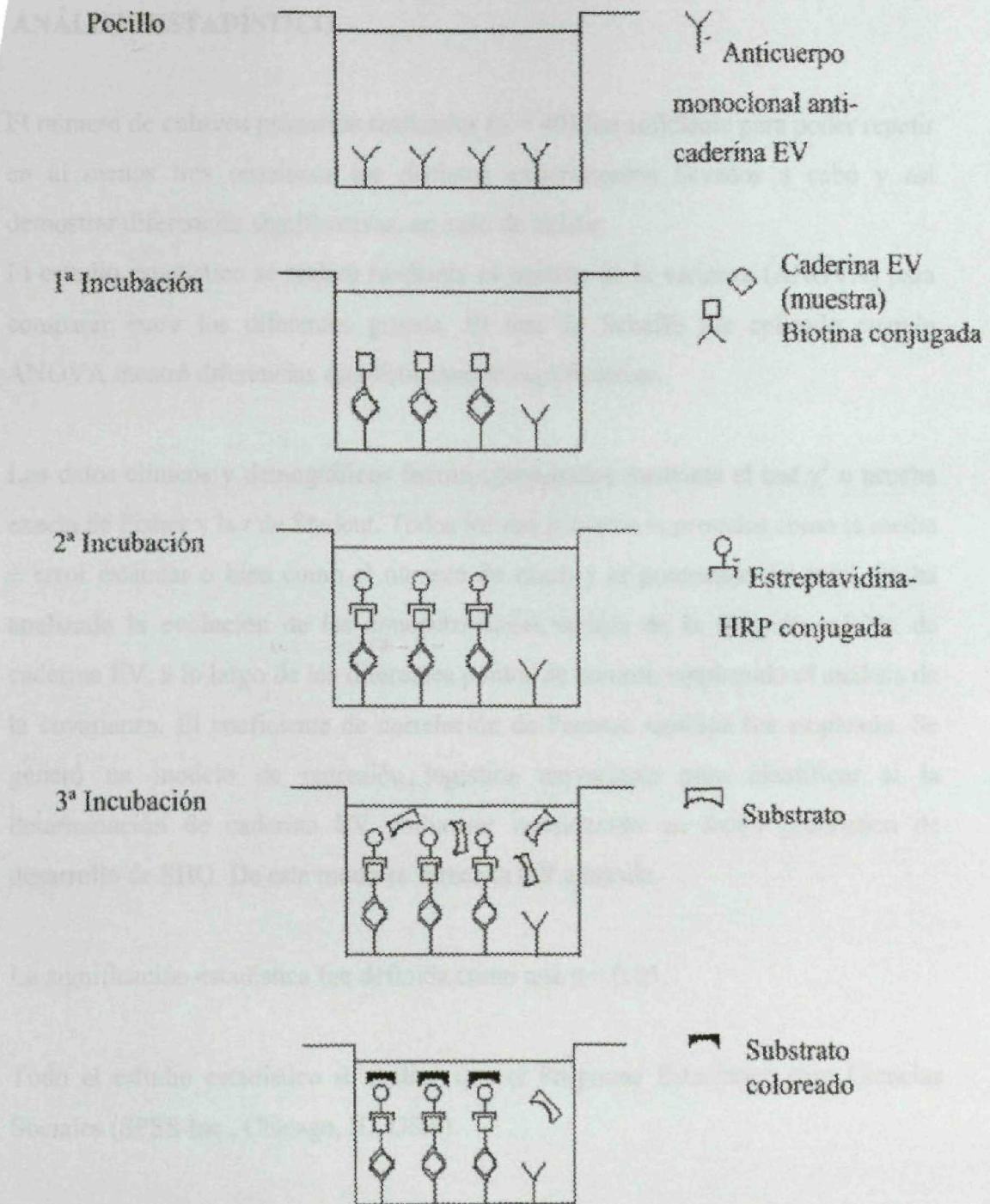
La concentración de la fracción soluble de la caderina EV humana se determinó mediante un kit de ELISA específico para la caderina EV (Bender MedSystems, Viena, Austria), siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

Brevemente, la técnica (figura 7) está basada en un anticuerpo monoclonal específico para la fracción soluble de la caderina EV con el que se cubre la superficie de los pocillos de la placa. Las muestras a analizar se añaden a los pocillos, de modo que la caderina EV que contengan estas muestras quedará ligada al anticuerpo inmovilizado. Tras el lavado de las proteínas no ligadas, se añade un anticuerpo conjugado con biotina que se unirá como un *sandwich* a la caderina EV ligada al anticuerpo inmovilizado en el fondo del pocillo. Después de lavar el exceso de anticuerpo, se añade estreptavidina-HRP (*horse radish peroxidase*) que se adherirá al anticuerpo anti-caderina EV conjugado con la biotina.

Una solución sustrato -con un cromógeno- se une con el reactivo HRP presente en los pocillos, y este proceso va a dar un color a los pocillos que será proporcional a la cantidad de caderina EV que existía en cada muestra. Esta reacción coloreada se detiene con un ácido y se mide la intensidad óptica del color en un lector de placas de ELISA, a una longitud de onda de 450 nm.

Según el fabricante, no hay reactividad cruzada con otras proteínas que pueda afectar al resultado. La sensibilidad para la caderina EV es de 0.15 ng/mL. Cada determinación se realizó por duplicado. El coeficiente de variación intra e inter-ensayo fue de 4.1 % y 7.2 %, respectivamente.





**Figura 7.** Técnica del ELISA para la detección cuantitativa de la fracción soluble de la caderina EV humana.



## 11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El número de cultivos primarios realizados ( $n = 40$ ) fue suficiente para poder repetir en al menos tres ocasiones los distintos experimentos llevados a cabo y así demostrar diferencias significativas, en caso de existir.

El estudio estadístico se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) para comparar entre los diferentes grupos. El test de Scheffe fue aplicado cuando ANOVA mostró diferencias estadísticamente significativas.

Los datos clínicos y demográficos fueron comparados mediante el test  $\chi^2$  o prueba exacta de Fisher y la  $t$  de Student. Todos los datos fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar o bien como el número de casos y el porcentaje del total. Se ha analizado la evolución de las concentraciones séricas de la fracción soluble de caderina EV, a lo largo de los diferentes puntos de control, empleando el análisis de la covarianza. El coeficiente de correlación de Pearson también fue empleado. Se generó un modelo de regresión logística univariante para identificar si la determinación de caderina EV podía ser considerado un factor pronóstico de desarrollo de SHO. De este modo se ofrece la OR ajustada.

La significación estadística fue definida como una  $p < 0.05$ .

Todo el estudio estadístico se realizó con el Programa Estadístico para Ciencias Sociales (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).







## **1. SECRECIÓN DE LA FRACCIÓN SOLUBLE DE LA CADERINA EV POR LOS CULTIVOS EN MONOCAPA DE HUVEC**

### **1.1. Experimentos dosis – respuesta**

#### **a) ESTRADIOL**

Primero comprobamos el efecto que produce el estradiol en la secreción de la fracción soluble de caderina EV por la monocapa de células endoteliales. La Fig. 8A muestra el resultado de dosis crecientes de estradiol sobre el cultivo HUVEC, pasadas 24 horas del estímulo. No hubo incremento en la liberación de caderina EV hasta que no se estimuló el medio de cultivo con una concentración de estradiol de  $10^{-3}$  mol/L. Sin embargo, la apariencia morfológica de las células sugirió más un efecto tóxico que una acción fisiológica, como se observa en la Fig. 9B. Aparte de este resultado, el estradiol no causó ninguna diferencia significativa en la liberación de caderina EV.

#### **b) hCG**

Después los cultivos celulares fueron estimulados con dosis crecientes de hCG durante 24 horas (Fig. 9C). Se observó un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) en la liberación de caderina EV a partir de 100 UI de hCG como se puede comprobar en la Fig. 8B.

#### **c) VEGF**

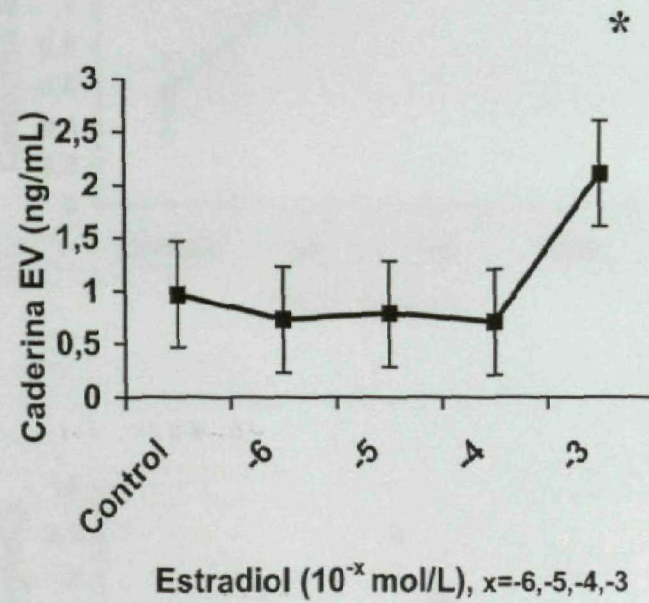
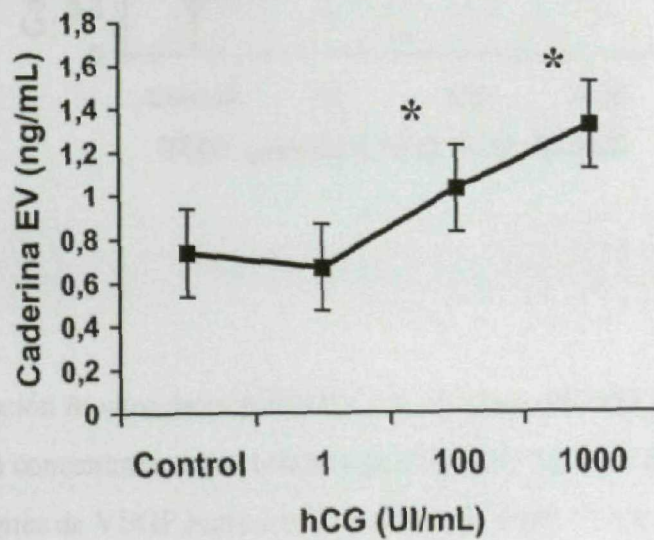
Posteriormente, se comprobó el efecto del VEGF sobre el cultivo HUVEC. Para este fin, añadimos concentraciones crecientes de VEGF y medimos la concentración de caderina EV, pasadas 24 horas. La dosis de 100 pg/mL de VEGF produjo un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) de la concentración de caderina EV y con la dosis de 1000 pg/mL se pudo comprobar un incremento también significativo, pero el aspecto de la monocapa celular, al microscopio óptico, sugirió el efecto tóxico de esta concentración de VEGF (Fig. 8C, 9D y 9E).

#### **d) VEGF + hCG**

Por ultimo, se comprobó el efecto aditivo que los estímulos de VEGF y hCG juntos ejercen sobre la liberación de caderina EV. Para ello, añadimos dosis crecientes de

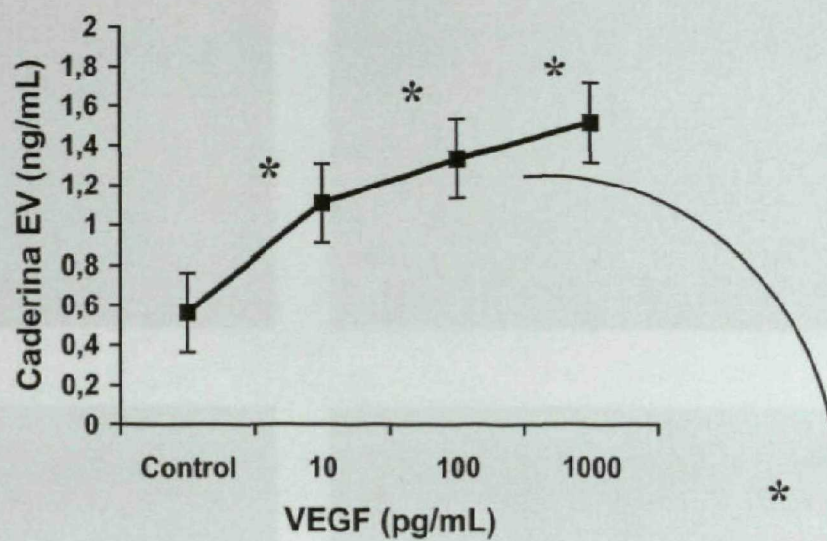


VEGF con una dosis fija de hCG (1000 UI) y se observó el aumento significativo en la liberación de caderina EV con el estímulo de 100 pg/mL de VEGF + 1000 UI de hCG frente al estímulo único con 100 pg/mL de VEGF (Fig. 8D y 9F)

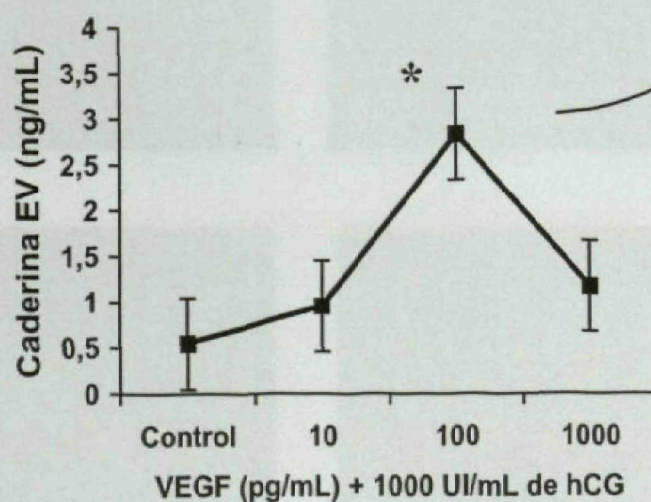
**A****B**



C



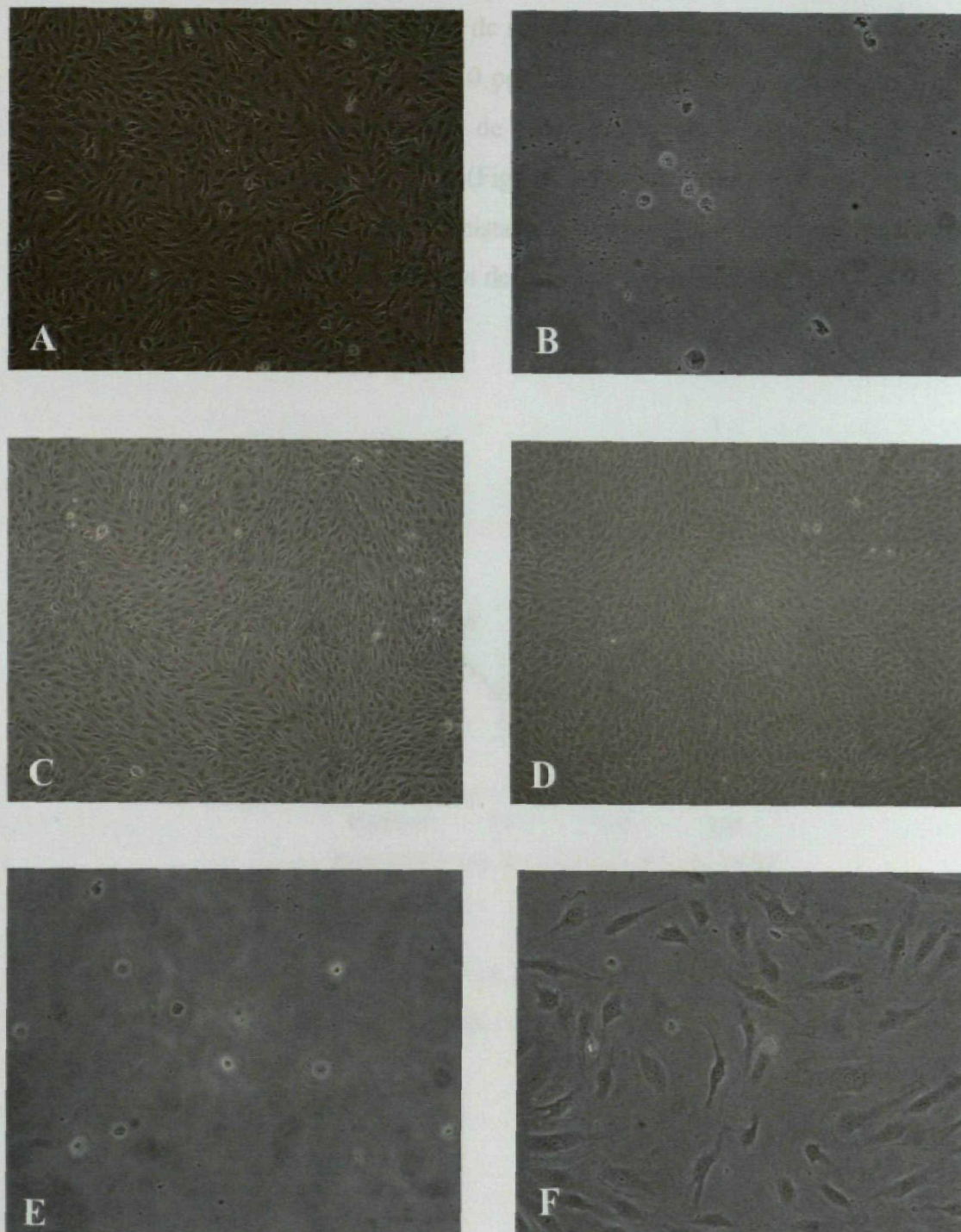
D



**Figura 8.** Secreción *in vitro* de caderina EV por el cultivo HUVEC tras 24 horas de tratamiento con concentraciones crecientes de estradiol (A), hCG (B), VEGF (C) y dosis crecientes de VEGF junto a una dosis fija de 1000 UI/mL de hCG (D).

Control: cultivo HUVEC en condiciones basales, n = 3. \* p<0.05.

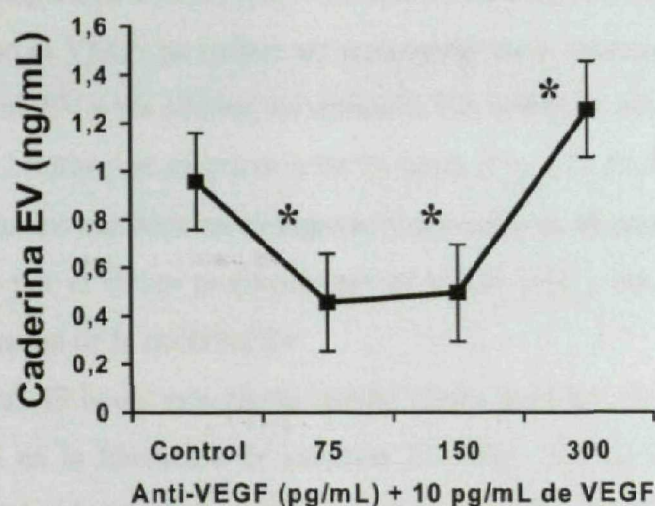




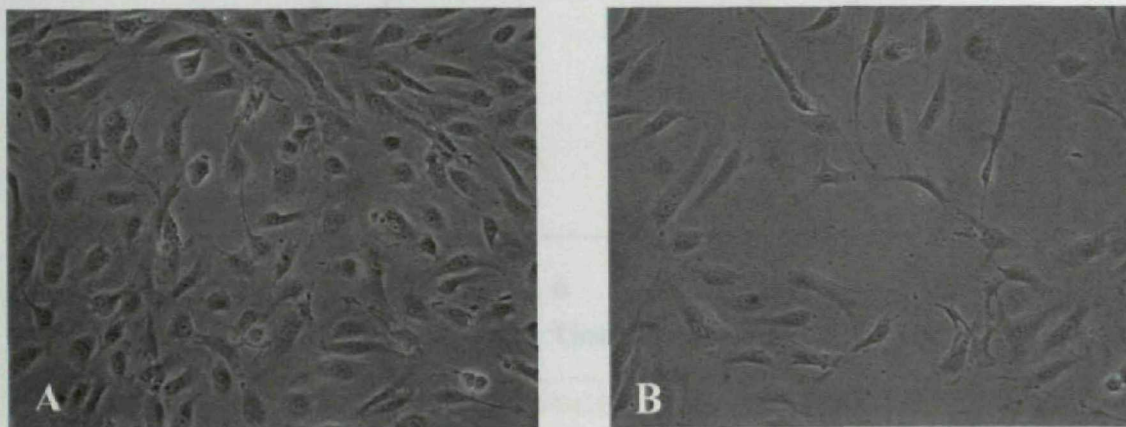
**Figura 9.** Apariencia morfológica de los cultivos HUVEC tras 24 horas de estímulo. Control (A), efecto tóxico de  $10^{-3}$  mol/L de estradiol (B), hCG 1000 UI/mL (C), VEGF 100 pg/mL (se puede observar el contorno irregular de las membranas celulares) (D), efecto tóxico de 1000 pg/mL de VEGF (E), efecto aditivo de 100 pg/mL de VEGF y 1000 UI/mL de hCG que provoca la separación celular (F).



Finalmente, se comprobó si el efecto del **VEGF** sobre la secreción de caderina EV podía ser bloqueado por dosis crecientes de anticuerpos **anti-VEGF**. Se comprobó que manteniendo una dosis fija de VEGF (10 pg/mL), se bloqueaba el efecto estimulante que el VEGF ejerce sobre la liberación de caderina EV tras la adición de 75 y 150 pg/mL de anti-VEGF, pasadas 24 horas (Fig. 10 y 11A). La adición de 300 pg/mL de anti-VEGF puede ejercer un efecto agonista paradójico sobre el metabolismo celular, que podría explicar la llamativa elevación de los niveles de caderina EV observados en este experimento (Fig. 11B).



**Figura 10.** Liberación de caderina EV en presencia del anticuerpo anti-VEGF en cultivos HUVEC,  $n = 3$ . \*  $p < 0,05$ .



**Figura 11.** Cultivo HUVEC estimulado con 10 pg/mL de VEGF. Aspecto morfológico tras el bloqueo con 150 pg/mL de anti-VEGF (A) y posible efecto agonista de 300 pg/mL de anti-VEGF (B).



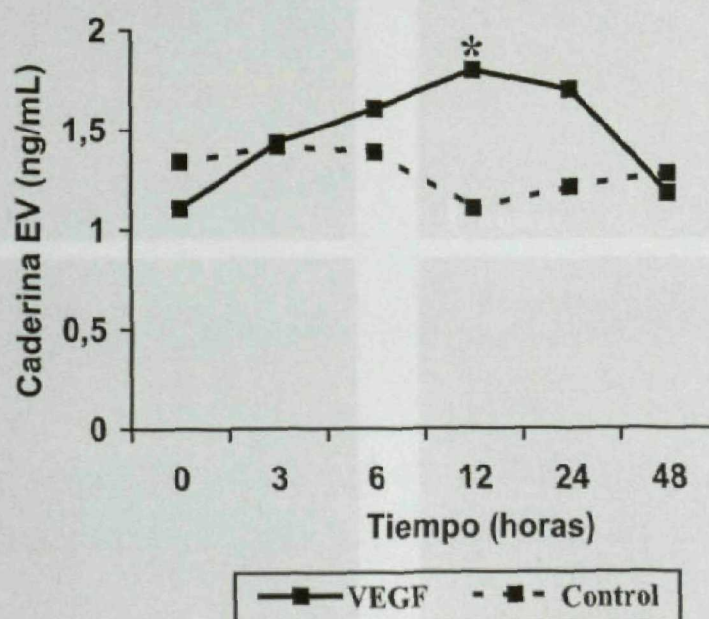
## 1.2. Experimentos de cinética temporal

Tras los experimentos anteriores se comprobó que el VEGF es el estímulo más eficaz en la liberación de caderina EV por los cultivos HUVEC. La dosis de 100 pg/mL consigue la máxima secreción de caderina EV, sin resultar tóxico para la monocapa celular.

Seguidamente, se diseñó un experimento para definir el inicio y la duración del efecto del VEGF sobre el cultivo HUVEC. Para ello, las monocapas celulares fueron estimuladas con una dosis fija de VEGF (100 pg/mL) y el medio condicionado se recogió a los **10 minutos del estímulo, 3, 6, 12, 24 y 48 horas**. Los resultados obtenidos fueron comparados con un cultivo control en condiciones basales.

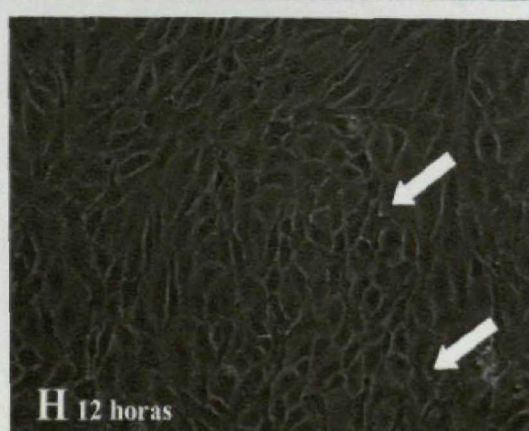
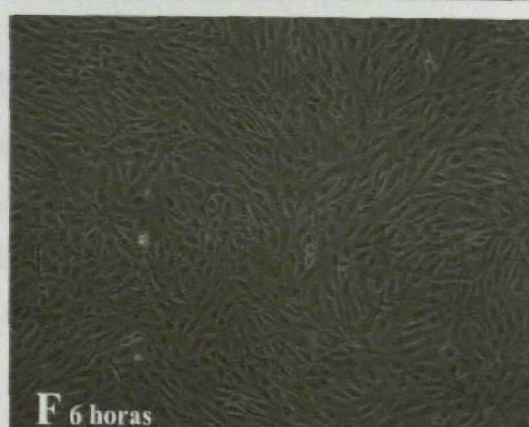
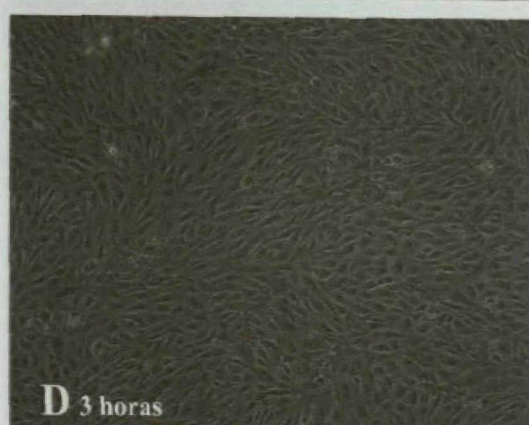
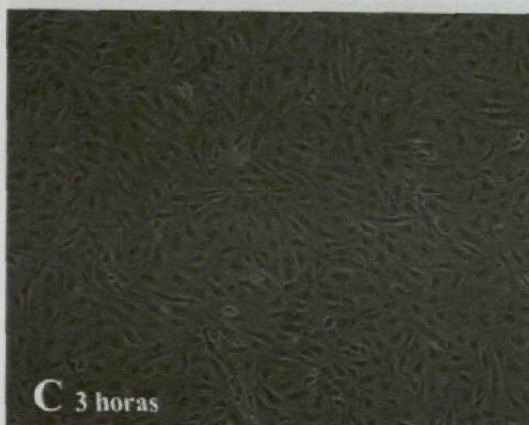
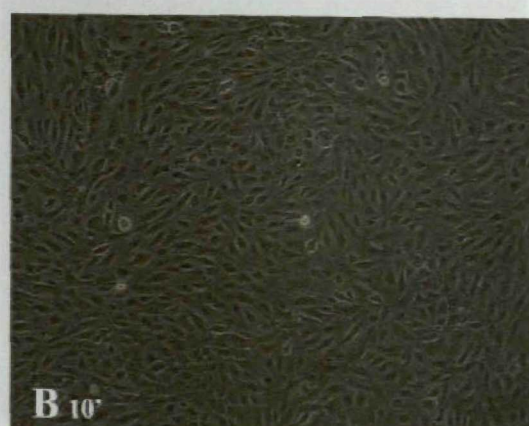
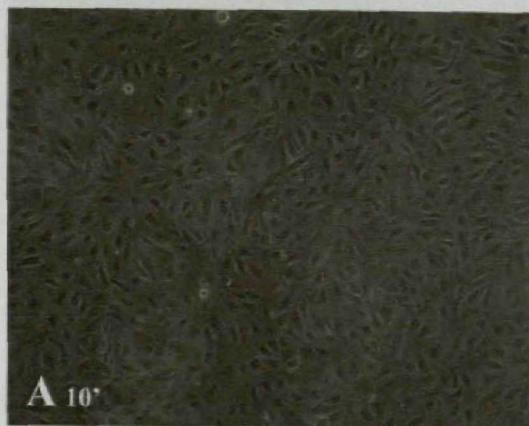
Comprobamos como el VEGF ya induce un incremento en la secreción de la fracción soluble de la caderina EV a las 3 horas del estímulo. Sin embargo, este aumento resulta significativo a las 12 horas y se mantiene a las 24 horas (Fig. 12). En la Fig. 13H, se ha señalado con flechas los cambios morfológicos observados en el contorno celular que podrían justificarse por el efecto producido por el VEGF [16] y que se traduce en el aumento de la liberación de la caderina EV.

Se observó que a las 48 horas este efecto resultó tóxico para las células, comprobado por la disminución en la liberación de caderina EV (Fig. 12), las alteraciones de la morfología celular y la pérdida de la confluencia del cultivo (Figura 13L).

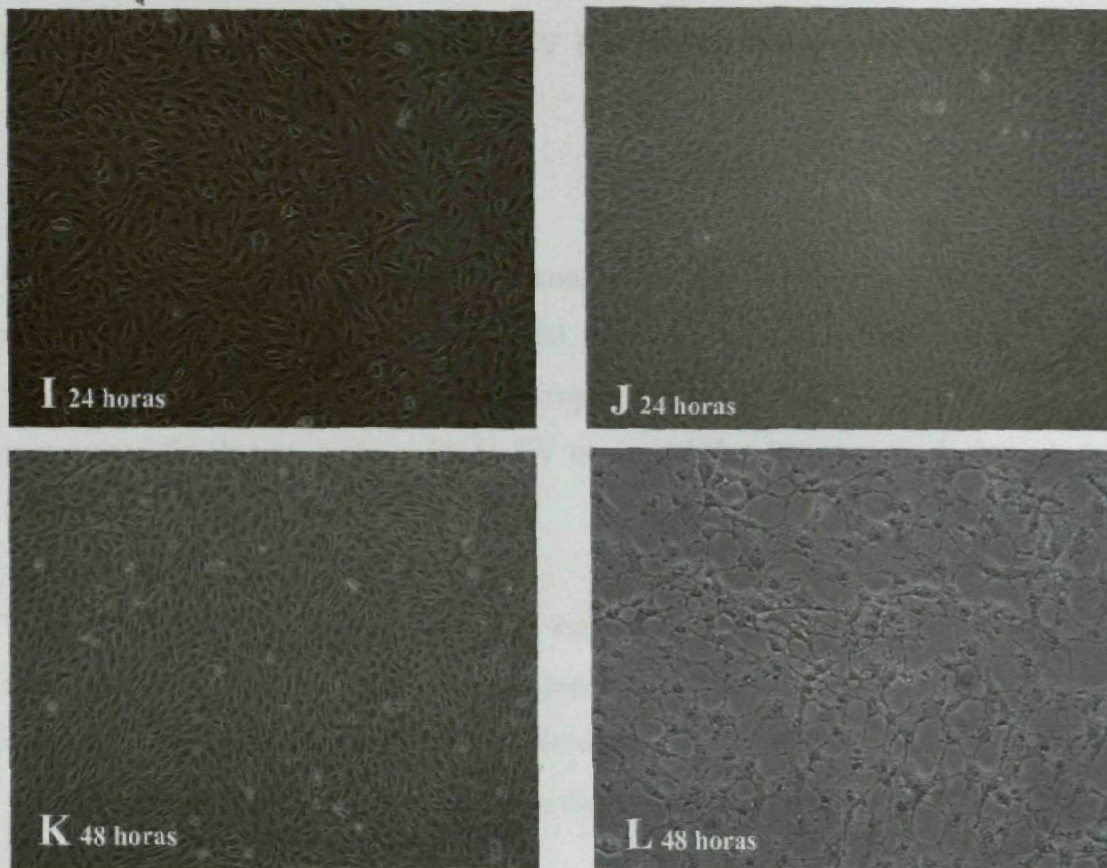


**Figura 12.** Liberación de caderina EV en el tiempo, tras el estímulo de una dosis fija de VEGF (100 pg/mL),  $n = 3$ . Tiempo 0 representa la secreción de caderina EV 10 minutos después de la adición de VEGF. \*  $p < 0.05$ .









**Figura 13.** Efecto de 100 pg/mL de VEGF sobre la apariencia morfológica de los cultivos HUVEC (B, D, F, H, J, L) comparados con cultivos en condiciones basales no estimulados (A, C, E, G, I, K). Los controles fueron realizados a los 10 minutos del estímulo (A, B), a las 3 horas (C, D), a las 6 horas (E, F), a las 12 horas (G, H), a las 24 horas (I, J) y a las 48 horas (K, L).



## 2. ESTUDIO DE LA VIABILIDAD Y LA PROLIFERACIÓN CELULAR DE LOS CULTIVOS HUVEC

### 2.1. Tinción con Azul de Tripán

En todos los experimentos realizados se comprobó posteriormente la viabilidad celular mediante la tinción con un colorante vital. Se empleó Azul de Tripán, que permitió valorar la lisis celular mediante microscopio óptico y así poder demostrar que el incremento fisiológico de la caderina EV no se debió a la rotura de las membranas celulares.

Tras el estímulo con dosis crecientes de **estradiol**, se comprobó que la dosis de  $10^{-3}$  mol/L resultó tóxica para las células, con pérdida total de la confluencia del cultivo. Por tanto, el incremento observado en la secreción de la fracción soluble de la caderina EV no puede ser justificado en este caso desde un punto de vista fisiológico.

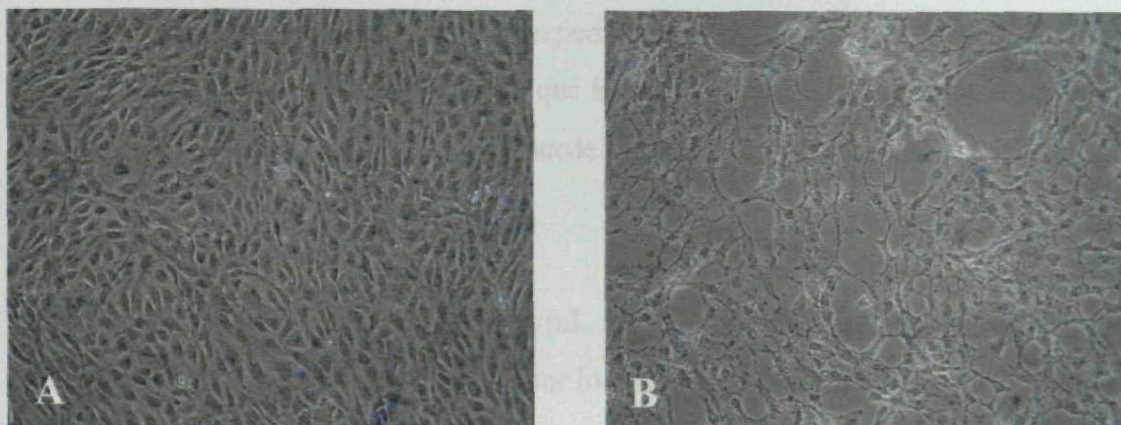
Los cultivos HUVEC estimulados con diferentes concentraciones de **hCG** no mostraron signos de rotura de las membranas celulares. El aumento en la liberación de caderina EV comprobado tras los estímulos con 100 y 1000 UI/mL de hCG puede ser explicado por la acción ejercida por la hormona sobre la estructura y el metabolismo del cultivo y no por la muerte celular.

El **VEGF** ejerce un efecto fisiológico con dosis de 10 y 100 pg/mL, observando que tras la adición de 1000 pg/mL se eleva la concentración de la fracción soluble de la caderina EV tras la muerte celular.

Lo mismo ocurre tras el bloqueo con el anticuerpo **anti-VEGF**, que disminuye la secreción de caderina EV con dosis de 75 y 150 pg/mL, manteniendo la morfología celular y la confluencia del cultivo. Cuando la dosis de anti-VEGF se incrementa hasta 300 pg/mL se produce una respuesta paradójica, elevándose la concentración de caderina EV por la pérdida de la confluencia del cultivo celular, probablemente debido a un efecto tóxico del anticuerpo.



En los experimentos de cinética temporal, el estímulo con 100 pg/mL de VEGF fue tóxico para el cultivo celular a partir de las 48 horas del estímulo. Esto se puede observar en la Fig. 14, cuando se compara con un cultivo control tras 48 horas en condiciones basales.



**Figura 14.** Cultivos HUVEC tras 48 horas en condiciones basales (A) y tras el estímulo con 100 pg/mL de VEGF (B).

## 2.2. Ensayo colorimétrico con MTT

La proliferación celular fue estudiada mediante el ensayo colorimétrico con MTT, comparando la concentración de cristales púrpura de los diferentes cultivos mediante espectrofotometría. El ensayo MTT cuantifica la proliferación y viabilidad celular, y así se puede demostrar que el incremento fisiológico de la caderina EV no se debe a cambios en la proliferación celular.

### a) ESTRADIOL

Los cultivos celulares estimulados con diferentes concentraciones de estradiol no mostraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la proliferación celular, excepto la concentración de  $10^{-3}$  mol/L de estradiol que presentó menor absorbancia, probablemente relacionado con la muerte celular provocada por esta dosis tóxica (Fig. 15A).

### b) hCG

Tras los estímulos con concentraciones crecientes de hCG tampoco se observaron diferencias significativas en la proliferación celular, manteniendo todos los cultivos la misma densidad celular al final del experimento (Fig. 15B).

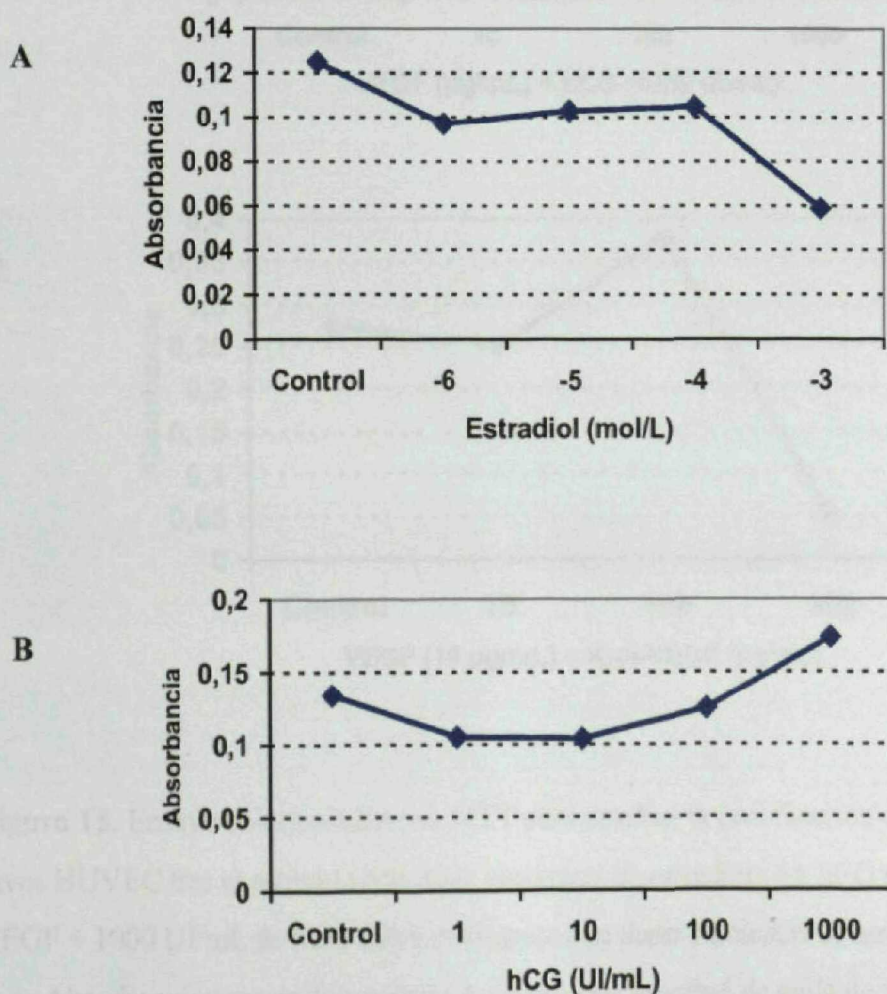


### c) VEGF y VEGF + hCG

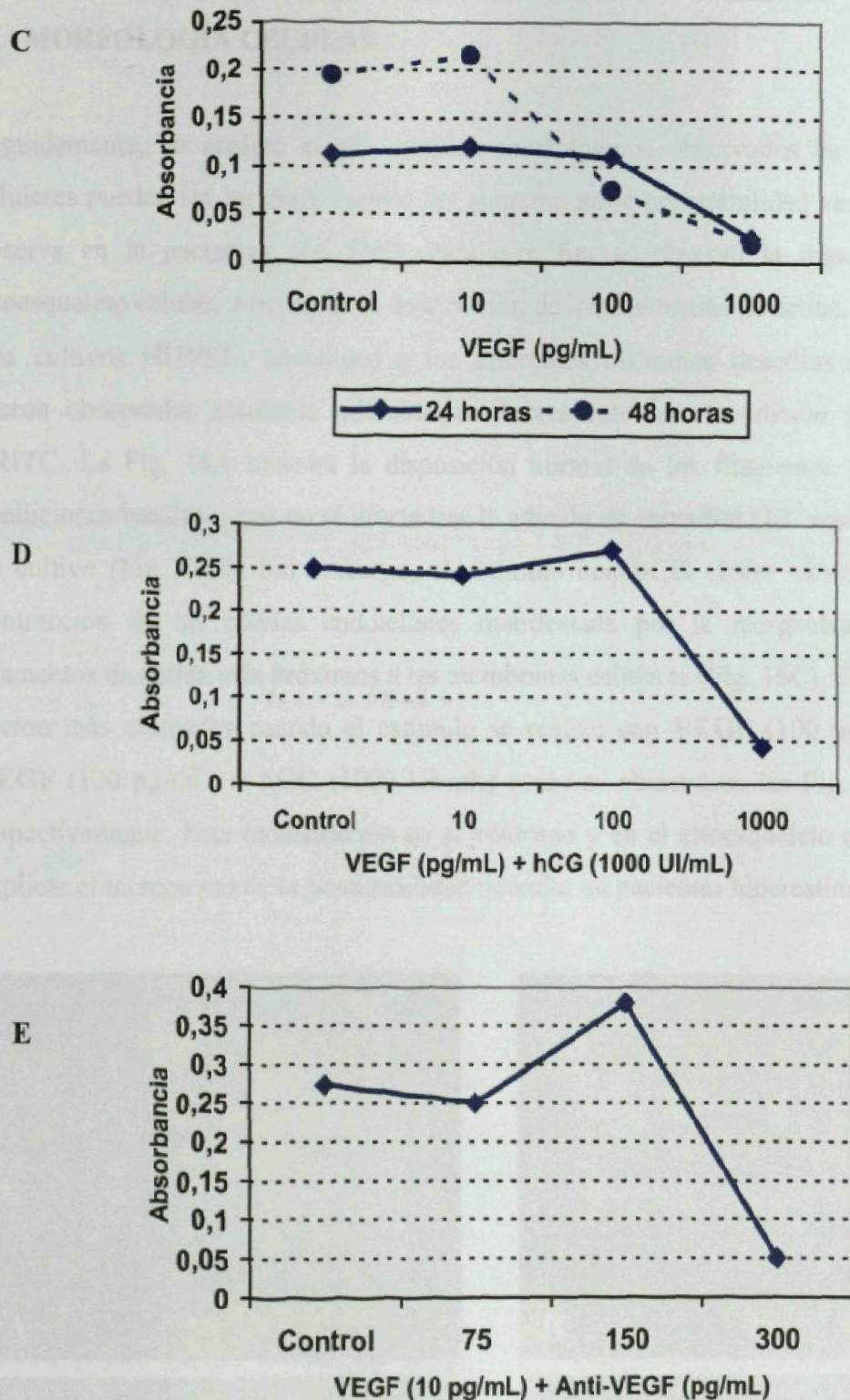
Los cultivos sometidos a diferentes estímulos de VEGF mostraron menor metabolismo celular con las dosis de 100 y 1000 pg/mL, a las 48 horas del estímulo. También se confirmó la toxicidad de la dosis de 1000 pg/mL a las 24 horas del inicio del estímulo (Fig. 15C). Al igual que cuando se realizó el experimento con 1000 pg/mL de VEGF y 1000 UI/mL de hCG (Fig. 15D). Esto justifica que las variaciones en la liberación de caderina EV, con dosis elevadas de VEGF y hCG, puede estar relacionado con la muerte celular.

### d) Anti-VEGF

En el bloqueo con dosis de 300 pg/mL de anti-VEGF también se observó la disminución en el metabolismo celular, por lo cual podemos deducir que el aumento en la liberación de la caderina EV puede ser producido por la lisis y muerte celular o por un efecto agonista paradójico (Fig. 15E).







**Figura 15.** Ensayo colorimétrico con MTT para estudiar la proliferación celular de los cultivos HUVEC tras el estímulo con dosis crecientes de estradiol (A), hCG (B), VEGF (C), VEGF + 1000 UI/mL de hCG (D) y el bloqueo con dosis crecientes de anti-VEGF (E).

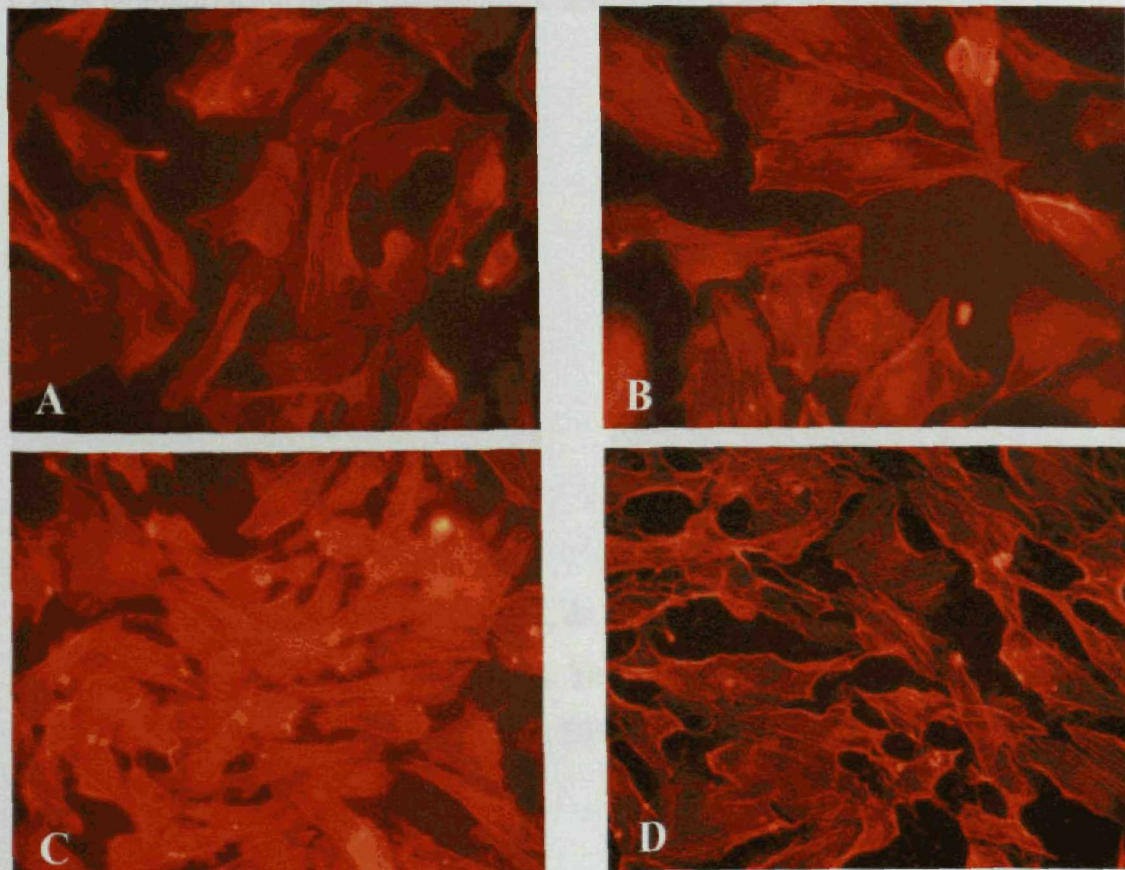
Absorbancia espectrofotométrica medida a una longitud de onda de 570 nm.



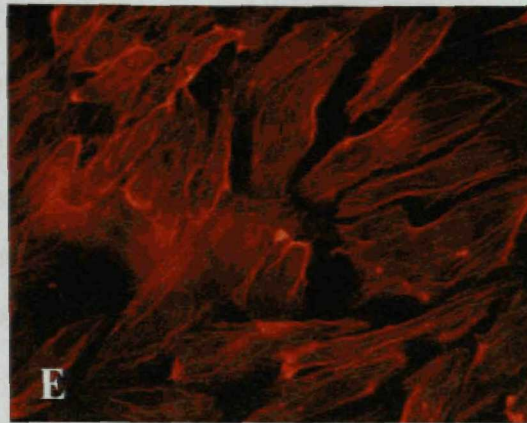
### 3. EXPERIMENTOS DE PERMEABILIDAD: CAMBIOS DE LA MORFOLOGÍA CELULAR

Seguidamente, se analizó si los cambios morfológicos observados en los cultivos celulares pueden ser los responsables del aumento en la permeabilidad vascular que se observa en la pacientes con SHO. Para este fin, se observó la organización del citoesqueleto celular, a través de la distribución de los filamentos de actina.

Los cultivos HUVEC, sometidos a los diferentes estímulos descritos previamente, fueron observados mediante microscopía fluorescente tras la adición de faloidina-TRITC. La Fig. 16A muestra la disposición normal de los filamentos de actina en condiciones basales y que no se afecta tras la adición de **estradiol** ( $10^{-5}$  mol/L) al medio de cultivo (Fig. 16B). Sin embargo, el estímulo con **hCG** (1000 UI/mL) induce la contracción de las células endoteliales manifestada por la reorganización de los filamentos de actina más próximos a las membranas celulares (Fig. 16C). Estos cambios fueron más marcados cuando el estímulo se realizó con **VEGF** (100 pg/mL) o con **VEGF** (100 pg/mL) + **hCG** (1000 UI/mL) como se observa en las Fig. 16D y 16E, respectivamente. Esta modificación en el contorno y en el citoesqueleto celular puede explicar el incremento de la permeabilidad vascular en pacientes hiperestimuladas.

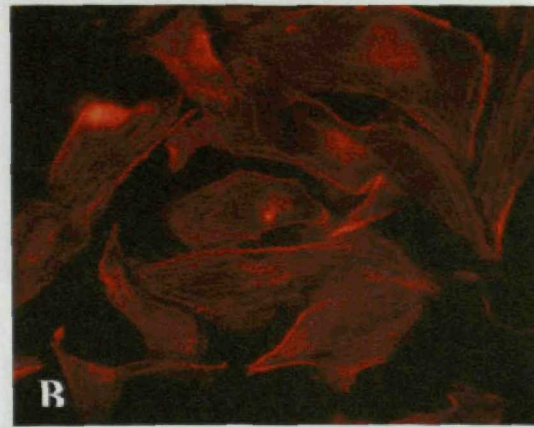






**Figura 16.** Permeabilidad capilar de HUVEC empleando microscopio de fluorescencia para analizar la disposición de los filamentos de actina. Control (A); células tratadas con  $10^{-5}$  mol/L de estradiol (B); células tratadas con 1000 UI/mL de hCG (C); células tratadas con 100 pg/mL de VEGF (D); células tratadas con 1000 UI/mL de hCG + 100 pg/mL de VEGF (E). Tinción con faloidina-TRITC, concentración final de 20 mg/mL.

El bloqueo del efecto del VEGF fue estudiado a través del tratamiento de los cultivos con VEGF y anticuerpos anti-VEGF. Los anticuerpos fueron capaces de inhibir el efecto del VEGF sobre los cambios morfológicos observados en el contorno endotelial y en la reorganización de los filamentos de actina (Fig. 17B).

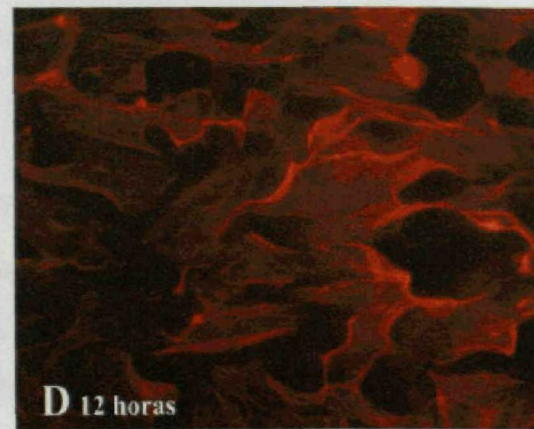
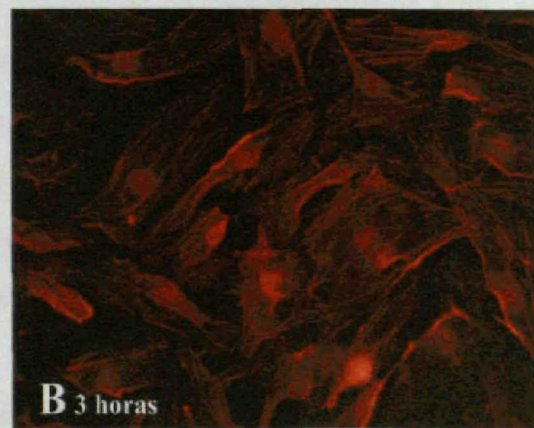


**Figura 17.** Células tratadas con 10 pg/mL de VEGF (A); células tratadas con 10 pg/mL de VEGF + 150 pg/mL de anti-VEGF (B). Tinción con faloidina-TRITC, concentración final de 20 mg/mL.

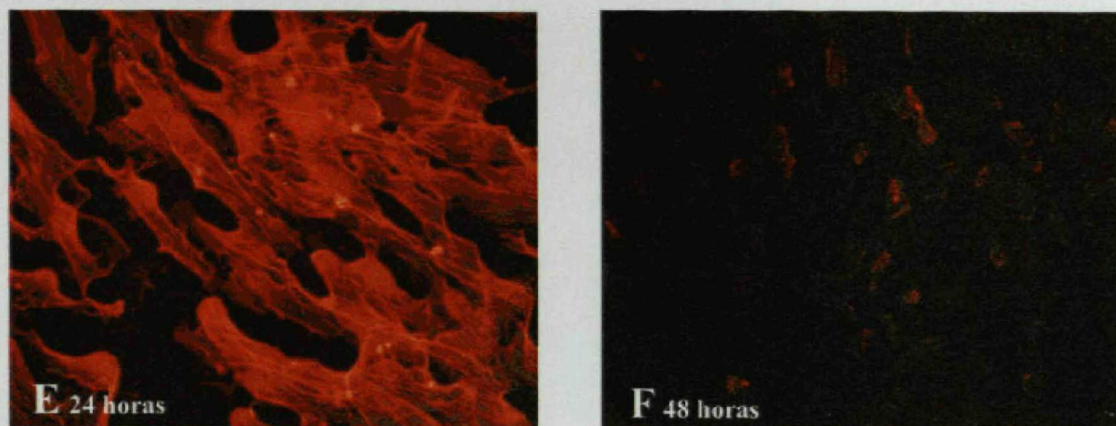


Por ultimo, se analizó el inicio y la duración de los cambios observados en el cultivo HUVEC tras el estímulo con 100 pg/mL de VEGF. Los cultivos celulares fueron tratados con VEGF bajo las mismas condiciones descritas previamente. El efecto del VEGF se detuvo tras la adición de faloidina-TRITC a los **10 minutos, 3, 6, 12, 24 y 48 horas**. Mediante estos experimentos se pudo comprobar que el VEGF induce los cambios en la morfología celular y en la organización de los filamentos de actina de manera muy precoz. A los 10 minutos ya se puede ver cierto grado de reorganización en los filamentos de actina mas próximos a las membranas celulares (Fig. 18A). A las 3 horas, en algunas zonas se inician los cambios en el contorno celular, mostrando cierto grado de contracción celular (Fig. 18B), que se hace más evidente a las 6 horas (Fig. 18C). A las 12 y 24 horas la morfología celular se observa totalmente alterada (Fig. 18D y 18E), con los filamentos de actina reorganizados y las membranas celulares contraídas, por tanto el espacio intercelular es mayor.

El efecto producido por el VEGF es tóxico a las 48 horas. El cultivo celular pierde por completo la confluencia y las células se despegan de la superficie del pocillo, por lo cual no es posible realizar el marcaje correcto con la faloidina-TRITC (Fig. 18F).







**Figura 18.** Efecto de 100 pg/mL de VEGF sobre HUVEC a lo largo del tiempo. Los cultivos fueron detenidos con faloidina-TRITC a los 10 minutos (A), 3 horas (B), 6 horas (C), 12 horas (D), 24 horas (E) y 48 horas (F). Tinción con faloidina-TRITC, concentración final de 20 mg/mL

#### 4. ESTUDIOS DE PERMEABILIDAD FUNCIONAL DE LA MONOCAPA HUVEC

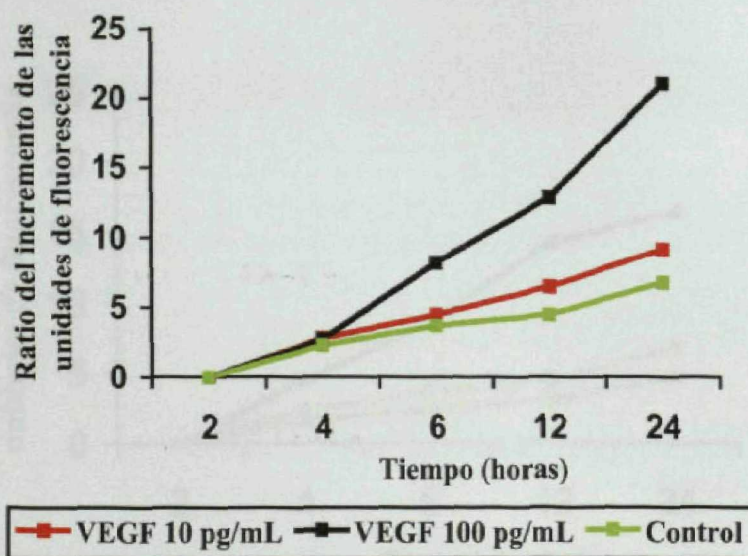
Hemos demostrado que el VEGF modifica la disposición de los filamentos de actina en las células endoteliales, modificando el contorno celular. Estos efectos se observan a los 10 minutos del estímulo y se hacen más pronunciados a las 24 horas del tratamiento. Estos datos indican que el VEGF promueve diversos cambios celulares que afectan a funciones biológicas como la permeabilidad y migración celular, que están regulados a través de su mecanismo de acción sobre la caderina EV.

Para confirmar si estas alteraciones morfológicas tienen alguna repercusión funcional se estudió el efecto del VEGF sobre la integridad de las uniones intercelulares, midiendo la permeabilidad de la monocapa endotelial confluyente. Para ello empleamos albúmina marcada con FITC.

Las células HUVEC cultivadas sobre filtros *Transwell* fueron tratadas con VEGF (10 y 100 pg/mL). La permeabilidad de las monocapas para la albúmina – FITC fue determinada en diferentes momentos (2, 4, 6, 12 y 24 horas) midiendo la intensidad de la fluorescencia del medio recogido del compartimiento inferior del *Transwell*. En el



experimento control, sin VEGF, la concentración de albúmina – FITC en el compartimiento inferior se fue incrementando lentamente en los diferentes momentos estudiados. Cuando las células fueron cultivadas en presencia de VEGF, se observó un aumento significativo de la permeabilidad para la albúmina – FITC, si se compara con el cultivo control. Estas diferencias fueron significativas después de las 6 horas del estímulo con VEGF y persistieron hasta las 24 horas (Fig. 19). Se observó además una mayor permeabilidad de la monocapa tras el cultivo con 100 pg/mL de VEGF, en comparación con 10 pg/mL.

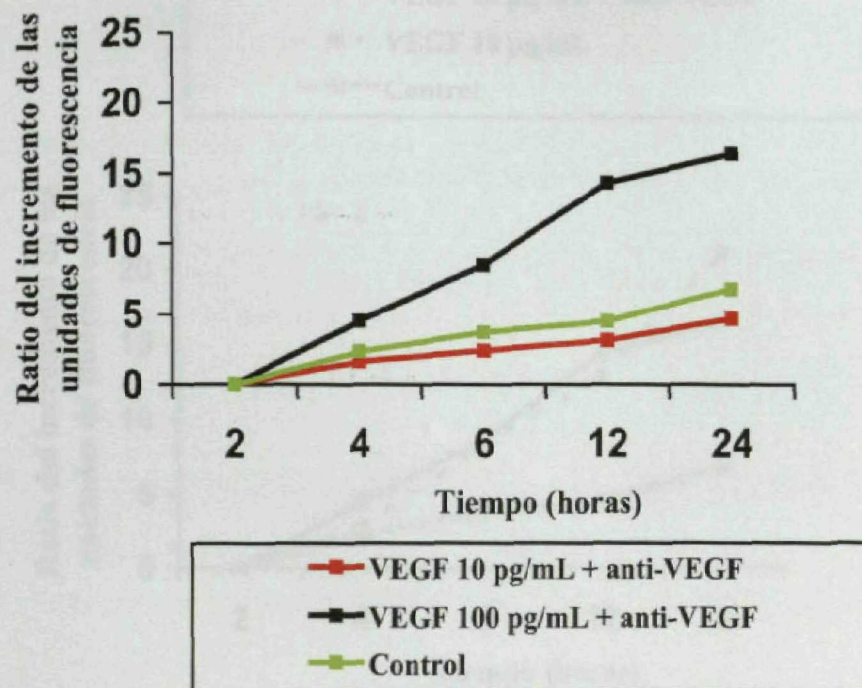


**Figura 19.** Ratio del incremento de las unidades de fluorescencia de albúmina - FITC que atraviesan las monocapas HUVEC sometidas al estímulo con el VEGF (10 y 100 pg/mL) comparados frente a un cultivo control. 6 horas,  $p < 0.05$ ; 12 horas,  $p < 0.01$ ; 24 horas  $p < 0.001$ .

Posteriormente, se comprobó si el anticuerpo anti-VEGF era capaz de bloquear el aumento en la permeabilidad de la monocapa producido por el estímulo del VEGF. Para ello se añadieron 150 pg/mL de anticuerpo anti-VEGF a los cultivos HUVEC estimulados con 10 y 100 pg/mL de VEGF. Se observó que el aumento en la permeabilidad producido por 10 pg/mL de VEGF era bloqueado por el anticuerpo, ya que la concentración de albúmina – FITC en el compartimiento inferior se incrementa lentamente a lo largo de los momentos estudiados. Este incremento describe una línea superponible a la que se observa en el cultivo control (Fig. 20 y 21A).



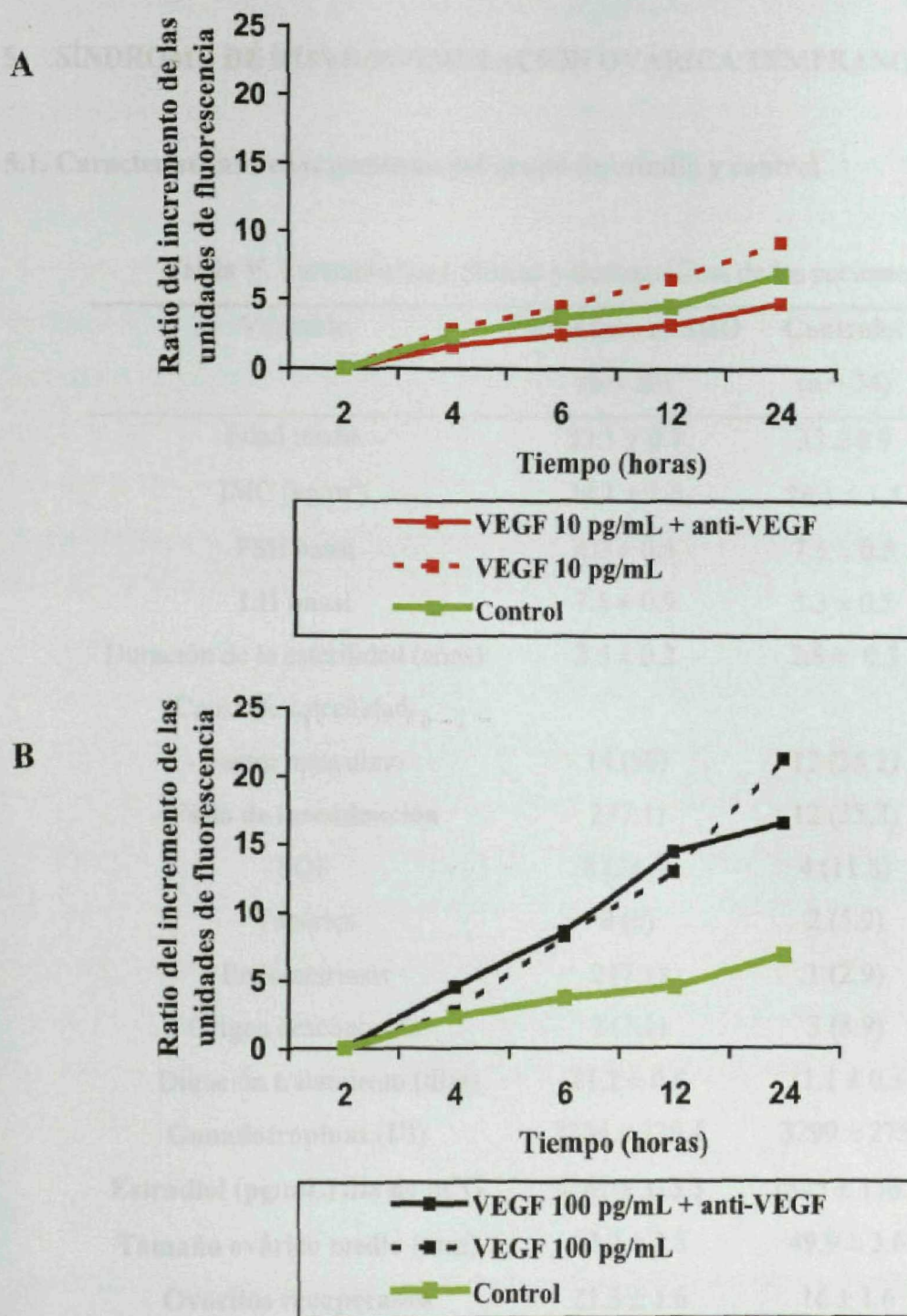
En los cultivos estimulados con 100 pg/mL de VEGF no se produjo el bloqueo con la dosis de 150 pg/mL de anti-VEGF (Fig. 20 y 21B). Los experimentos dosis – respuesta descritos previamente demostraron que cuando la dosis de anti-VEGF se incrementa hasta 300 pg/mL se produce una respuesta paradójica, elevándose la concentración de caderina EV y se observa la pérdida de la confluencia del cultivo celular, probablemente debido a un efecto tóxico del anticuerpo. Por tanto, no se probaron dosis superiores a 150 pg/mL de anticuerpo.



**Figura 20.** Ratio del incremento de las unidades de fluorescencia de albúmina - FITC que atraviesan las monocapas HUVEC sometidas al estímulo con el VEGF (10 y 100 pg/mL) + anticuerpo anti-VEGF (150 pg/mL), comparados frente a un cultivo control.

6 horas,  $p < 0.05$ ; 12 horas,  $p < 0.01$ ; 24 horas  $p < 0.01$ .





**Figura 21.** Ratio del incremento de las unidades de fluorescencia de albúmina - FITC que atraviesan las monocapas HUVEC sometidas al estímulo con el 10 pg/mL de VEGF comparado con 10 pg/mL de VEGF + 150 pg/mL de anti-VEGF (A), y el estímulo con 100 pg/mL de VEGF comparado con 100 pg/mL de VEGF + 150 pg/mL de anti-VEGF (B). Se puede comprobar que en el caso de 100 pg/mL de VEGF, el anticuerpo no produce bloqueo en la permeabilidad del cultivo y se describen dos líneas superponibles.



## 5. SÍNDROME DE HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA TEMPRANO

### 5.1. Características de las pacientes del grupo de estudio y control

**Tabla V.** Características clínicas y demográficas de las pacientes

Variable	Pacientes con SHO (n = 28)	Controles (n = 34)	p
Edad media	32.1 ± 0.7	33 ± 0.9	0.421
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	24.1 ± 1.5	26.1 ± 1,5	0.412
FSH basal	6.9 ± 0.5	7.1 ± 0.5	0.840
<b>LH basal</b>	7.5 ± 0.9	5.3 ± 0.5	<b>0.049</b>
Duración de la esterilidad (años)	2.5 ± 0.2	2.8 ± 0.3	0.409
Causa de esterilidad:			
- Factor masculino	14 (50)	12 (35.2)	0.305
<b>- Fallo de inseminación</b>	2 (7.1)	12 (35.2)	<b>0.013</b>
- SOP	8 (28.6)	4 (11.8)	0.117
- Tubárica	0 (0)	2 (5.9)	0.497
- Endometriosis	2 (7.1)	1 (2.9)	0.585
- Origen desconocido	2 (7.1)	3 (8.9)	1.0
Duración tratamiento (días)	11,2 ± 0,4	11.1 ± 0.3	0.759
<b>Gonadotropinas (UI)</b>	2234 ± 229.4	3299 ± 275	<b>0.006</b>
<b>Estradiol (pg/mL) día de hCG</b>	3747 ± 315.3	1825 ± 156.7	<b>0.001</b>
<b>Tamaño ovárico medio (mm)</b>	67.2 ± 3.5	49.9 ± 3.6	<b>0.001</b>
<b>Ovocitos recuperados</b>	21.3 ± 1.6	16 ± 1.6	<b>0.028</b>
Metafase II	16.1 ± 1.3	12.6 ± 1.6	0.123
Embriones totales	11.6 ± 1.2	9 ± 1.4	0.181
Embriones transferidos	2.7 ± 0.1	2.6 ± 0.1	0.667
Embriones congelados	3.2 ± 0.9	2.5 ± 0.8	0.567
Gestaciones	10 (38.5)	16 (51.6)	0.425
Gemelares	4 (44.4)	4 (25)	0.773

Nota: Los valores se presentan como media ± error estándar o n° (%).



Las características de las participantes estudiadas para el SHO temprano se resumen en la Tabla V. Se ha marcado con estilo negrita aquellas variables que resultaron estadísticamente significativas. Los dos grupos no fueron heterogéneos para la edad media de las pacientes, el índice de masa corporal (IMC) y la determinación de FSH basal el tercer día del ciclo menstrual. Si se observan niveles de LH significativamente mayores en el grupo que desarrolló el SHO temprano, justificado por la mayor proporción de pacientes diagnosticadas de síndrome de ovarios poliquísticos que se incluyeron en el grupo de estudio.

Los dos grupos no fueron heterogéneos también en la duración en años ni en la causa de la esterilidad, salvo un número de casos clasificados con el diagnóstico de fallo de inseminación significativamente mayor en el grupo control, que no resulta relevante en los resultados de este estudio.

La media de duración en días de la estimulación ovárica fue similar en ambos grupos, pero se pautaron dosis medias de gonadotropinas superiores en el grupo control. Esto se debe probablemente a la inclusión en el grupo control de pacientes con menos riesgo de hiperestimulación y menor respuesta al tratamiento de estimulación.

La media de la concentración sérica de estradiol, el día de la aplicación de la hCG, fue superior a 3500 pg/mL en las pacientes hiperestimuladas y resultó estadísticamente significativo respecto al grupo control.

En los resultados obtenidos en el laboratorio de FIV, en el grupo de pacientes hiperestimuladas se recuperaron un número medio mayor de ovocitos, 21 frente a 16. El resto de variables estudiadas nos mostraron dos grupos no heterogéneos.

## **5.2. Determinación de los niveles séricos de caderina EV**

Se ha analizado la evolución de los niveles séricos de caderina EV (ng/mL) a lo largo de los cinco puntos de control descritos en el apartado de materiales y métodos. Para ello se ha empleado el análisis de la covarianza, considerando como nivel basal la concentración de caderina EV el día de la punción folicular.

La Tabla VI resume los hallazgos y significación de la diferencia, demostrándose que sin que haya heterogeneidad basal, se identifican niveles séricos mayores de caderina

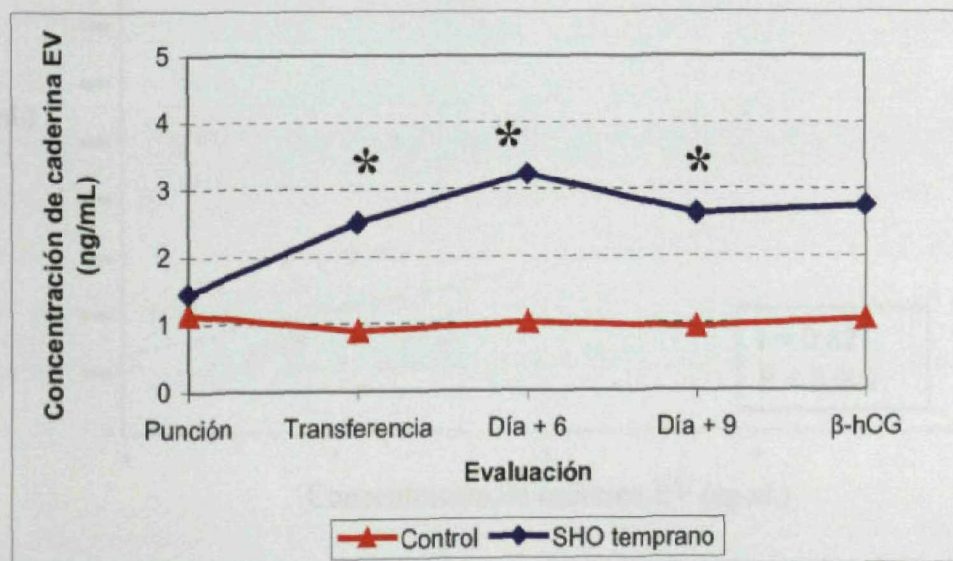


EV en el momento de la transferencia embrionaria ( $p = 0.016$ ), en el control realizado en el día + 6 ( $p = 0.001$ ) y en el control realizado en el día + 9 ( $p = 0.036$ ). El día de la determinación de  $\beta$ -hCG se detecta la misma tendencia ( $p = 0.097$ ), aunque no de forma estadísticamente significativa.

**Tabla VI.** Concentraciones séricas medias de caderina EV en las pacientes con SHO temprano y en los controles en cada uno de los puntos estudiados. Los valores son la media  $\pm$  desviación estándar (DE). Los valores de la caderina EV se expresan en ng/mL.

	Grupo control			SHO temprano			p
	n	Media	DE	n	Media	DE	
Punción	17	1.13	0.47	9	1.45	0.47	0.112
Transferencia	15	0.88	0.28	7	2.50	2.41	<b>0.016</b>
Día + 6	26	1.01	0.32	7	3.23	3.00	<b>0.001</b>
Día + 9	23	0.94	0.21	9	2.64	3.80	<b>0.036</b>
$\beta$ -hCG	7	1.05	0.22	5	2.74	2.48	0.097

Comparado con los controles, las pacientes que desarrollaron el SHO temprano severo tuvieron concentraciones séricas de caderina EV significativamente mas altas (Fig. 22). Los valores descendieron a partir del día + 6, coincidiendo con la mejoría clínica de las pacientes, pero no llegaron a alcanzar niveles normales el día de la determinación de la  $\beta$ -hCG, momento en el cual las pacientes hiperestimuladas suelen presentar una remisión casi total de los síntomas y signos del síndrome.



**Figura 22.** Evolución de las concentraciones séricas de caderina EV. \*  $p < 0.05$



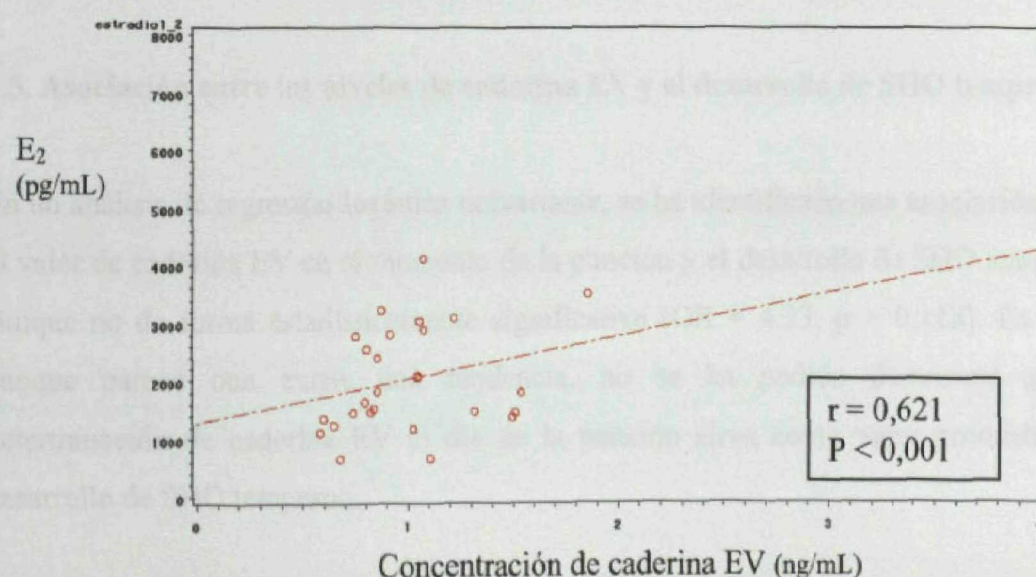
### 5.3. Correlación entre los niveles séricos de estradiol (el día de la aplicación de la hCG) y las concentraciones séricas de caderina EV

La correlación estadística entre el nivel sérico de estradiol, el día de la inducción de la ovulación con hCG, y las concentraciones séricas de caderina EV en todos los momentos fue calculada mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

Se observó una correlación estadísticamente significativa entre la concentración de caderina EV el día + 6 del seguimiento y el nivel sérico de estradiol, el día de la hCG (Tabla VII y Fig. 23). En el resto de los momentos no se comprobó significación estadística, pero sí la tendencia positiva que a mayor nivel de estradiol se observa mayor concentración de caderina EV.

**Tabla VII.** Correlación entre las concentraciones séricas de caderina EV y los niveles de estradiol.  $r = r$  de Pearson.

Momento	r	p
Punción	0,314	0,155
Transferencia	0,350	0,155
<b>Día + 6</b>	<b>0,621</b>	<b>0,001</b>
Día + 9	0,315	0,102
$\beta$ -hCG	0,643	0,062



**Figura 23.** Correlación entre las concentraciones séricas de caderina EV el día + 6 y los niveles séricos de estradiol (pg/mL), determinados el día de la administración de hCG.



#### 5.4. Correlación entre el número de ovocitos recuperados y las concentraciones séricas de caderina EV

Al igual que en el punto anterior, se estudió si existía alguna correlación entre la concentración sérica de caderina EV y el número de ovocitos recuperados el día de la punción folicular.

No se observó correlación en ninguno de los momentos estudiados (Tabla VIII). De estos resultados se puede concluir que la concentración sérica de caderina EV no está directamente relacionada con el número de ovocitos aspirados.

**Tabla VIII.** Correlación entre la concentración sérica de caderina EV y el número de ovocitos aspirados.  $r = r$  de Pearson.

Momento	r	p
Punción	0,081	0,630
Transferencia	0,312	0,088
Día + 6	0,237	0,126
Día + 9	0,026	0,866
$\beta$ -hCG	0,301	0,197

#### 5.5. Asociación entre los niveles de caderina EV y el desarrollo de SHO temprano

En un análisis de regresión logística univariante, se ha identificado una asociación entre el valor de caderina EV en el momento de la punción y el desarrollo de SHO temprano, aunque no de forma estadísticamente significativa (OR = 4.33;  $p = 0,118$ ). Es decir, aunque parece que existe una tendencia, no se ha podido demostrar que la determinación de caderina EV el día de la punción sirva como valor pronóstico de desarrollo de SHO temprano.



## 6. SÍNDROME DE HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA TARDÍO

### 6.1. Características de las pacientes del grupo de estudio y control

**Tabla IX.** Características clínicas y demográficas de las pacientes

Variable	SHO tardío (n = 8)	Controles (n = 6)	p
Edad media	31.8 ± 0.5	33 ± 0.8	0.105
Duración de la esterilidad (años)	2.3 ± 0.7	2.6 ± 0.4	0.234
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	23.3 ± 0.4	25.2 ± 0.5	0.456
Causa de infertilidad:			
- Factor masculino	2 (25)	0 (0)	0.324
- Fallo de inseminación	2 (25)	0 (0)	0.324
- SOP	1 (12,5)	2 (33,3)	0.145
- Tubárica	1 (12,5)	0 (0)	0.324
- <b>Endometriosis</b>	2 (25)	4 (66,6)	<b>0.049</b>
- Origen desconocido	0 (0)	0 (0)	0.345
<b>Estradiol (pg/mL)</b>	3844 ± 299	171 ± 15	<b>0.001</b>
<b>Tamaño ovárico medio (mm)</b>	69.3 ± 2.7	29.2 ± 1.5	<b>0.001</b>
<b>Ascitis</b>	8 (100)	0 (0)	<b>0.001</b>
Embriones transferidos	2.4 ± 0.3	2.1 ± 0.3	0.267
Gestaciones	8 (100)	6 (100)	0.667
Gemelares	4 (50)	2 (33.3)	0.181

Nota: Los valores se presentan como media ± error estándar o n° (%).

Las características de las participantes estudiadas para el SHO tardío se resumen en la Tabla IX. Se ha marcado con estilo negrita aquellas variables que resultaron estadísticamente significativas. Los dos grupos no fueron heterogéneos para la edad media de las pacientes, el índice de masa corporal (IMC) y años de duración de la esterilidad.



Los dos grupos no fueron heterogéneos en el diagnóstico de la causa de la esterilidad, salvo un número de casos clasificados con el diagnóstico de endometriosis significativamente mayor en el grupo control, que no resulta relevante en los resultados de este estudio.

La media de las concentraciones séricas de estradiol fue superior a 3500 pg/mL en las pacientes (medido el día de la inducción de la ovulación con hCG) y resultó estadísticamente significativo respecto al grupo control (medido el día del control ecográfico del endometrio). Se debe aclarar que el tipo de tratamiento empleado en el grupo control (pacientes sometidas a un ciclo de donación de ovocitos) precisa de la inhibición transitoria de la función ovárica ya que puede influir negativamente en la preparación endometrial. Esto justifica los niveles bajos de estradiol observados en el grupo control.

Desde el punto de vista clínico, y como era de esperar, se observaron diferencias estadísticas en cuanto al tamaño ovárico medio y a la existencia de ascitis.

En los resultados obtenidos en el laboratorio de FIV, el número de embriones transferidos, la tasa de gestación y de embarazos múltiples nos mostraron dos grupos no heterogéneos.

## 6.2. Determinación de los niveles séricos de caderina EV

Se ha analizado la evolución de los niveles séricos de caderina EV (ng/mL) a lo largo de los tres puntos de control descritos en el apartado de materiales y métodos. Para ello se ha empleado el análisis de la covarianza, considerando como nivel basal la concentración de caderina EV el día de la determinación de  $\beta$ -hCG en sangre.

La Tabla X resume los hallazgos y significación de la diferencia de cada uno de los momentos estudiados. Se observa que no hay diferencias significativas, aunque los valores en el grupo de SHO tardío son más altos que en los controles.

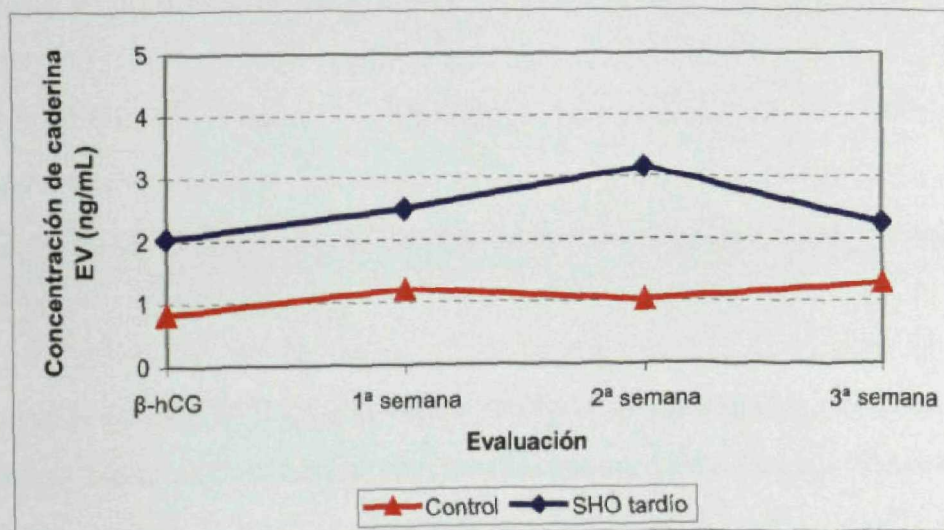
La no significación estadística se puede justificar por el número de casos incluidos en los dos grupos.



En la Fig. 24, se puede observar la evolución de los valores de caderina EV en los dos grupos. Aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas, sí se puede comprobar que las pacientes que desarrollaron síntomas y signos compatibles con SHO tardío, tuvieron concentraciones séricas mayores de caderina EV que las observadas en el grupo control.

**Tabla X.** Concentraciones séricas medias de caderina EV en las pacientes con SHO tardío y en los controles en cada uno de los puntos estudiados. Los valores son la media  $\pm$  desviación estándar (DE). Los valores de la caderina EV se expresan en ng/mL.

	Grupo control			SHO tardío			p
	n	Media	DE	n	Media	DE	
$\beta$ -hCG	4	0.82	0.05	8	2.04	2.11	0.287
1ª semana	4	1.20	0.61	4	2.50	0.67	0.648
2ª semana	5	1.01	0.42	5	3.16	3.21	0.177
3ª semana	4	1.29	0.67	4	2.26	2.18	0.427



**Figura 24.** Evolución de las concentraciones séricas de caderina EV.







### a) De los factores implicados en la fisiopatología del síndrome de hiperestimulación ovárica

En el síndrome de hiperestimulación ovárica, los mecanismos fisiopatológicos que desencadenan los síntomas clínicos característicos resultan desconocidos. Se ha demostrado la existencia de varios factores de riesgo, y se sabe que su desarrollo es autolimitado en el tiempo. Aunque se desconoce con exactitud su fisiopatología, se sabe que se relaciona con la liberación de sustancias vasoactivas que actúan sobre las células endoteliales [16]. Como consecuencia de esta acción, se incrementa la permeabilidad capilar sistémica, permitiendo el paso de un exudado rico en proteínas, que crea un tercer espacio. La clínica de este síndrome se describe por la aparición de edemas, ascitis, derrame pleural y pericárdico, desequilibrio hidroelectrolítico, depleción intravascular, hemoconcentración, fenómenos tromboembólicos y afectación de los órganos sensibles a la hipovolemia. Este síndrome puede llegar a poner en peligro la vida de la paciente como ya describieron Balasch *et al* [10] y Fábregues *et al* [64, 69].

Aboulghar [14] observó que las concentraciones séricas de **estradiol** son un buen marcador predictivo del desarrollo de SHO, pero por sí solo el estradiol no es capaz de iniciar este síndrome. Sin embargo, tras la inducción de la ovulación con **hCG** se desencadenan los síntomas y signos característicos, en aquellas pacientes de riesgo. Gómez *et al* [119] demostraron en un modelo animal que la sustitución de hCG por LH mantiene la tasa de ovulación y disminuye la permeabilidad vascular, evitando los riesgos de esta enfermedad. Manau *et al* [121] confirmaron en pacientes sometidas a ciclos de FIV, que el empleo de LH en lugar de hCG para la inducción de la maduración folicular y su luteinización mantiene los mismos resultados en cuanto a tasa de gestación (60%). En cambio, en el grupo tratado con LH se observó un menor porcentaje de cambios en la presión arterial media, en el gasto cardiaco, en la resistencia vascular periférica y en las concentraciones plasmáticas de aldosterona, norepinefrina y actividad plasmática de la renina. Estos trabajos confirman el papel preponderante de la hCG como desencadenante principal del SHO.

Hazzard *et al* [30] demostraron que tras la administración de hCG se produce un incremento significativo en las concentraciones séricas de **VEGF**, sugiriendo el papel



que ejerce la hCG / LH sobre las células de la granulosa luteinizadas en la síntesis y secreción de VEGF. El aumento en la concentración de VEGF y otras citoquinas, como la IL-6, en las pacientes, con o sin SOP, que desarrollaron un SHO fue confirmado por Pellicer *et al* [15]. Posteriormente, Manau *et al* [55, 56] observaron que las pacientes sometidas a ciclos de FIV que no desarrollan un SHO presentaron cambios hemodinámicos durante la fase lútea, pero no se demostraron modificaciones en las concentraciones circulantes de las citoquinas implicadas en el SHO, como el VEGF. Por tanto, el VEGF es un factor implicado directamente en la fisiopatología del SHO, que no se modifica de forma significativa a no ser que la paciente desarrolle los síntomas y signos de este síndrome.

Gómez *et al* [32] emplearon un modelo *in vivo* con ratas hiperestimuladas y probaron que el VEGF es producido, expresado y secretado en el ovario y produce el aumento de la permeabilidad vascular en respuesta a la aplicación de hCG. Estos autores demostraron la existencia de concentraciones elevadas de VEGF tanto en las células de la granulosa luteinizadas como en el endotelio del cuerpo lúteo.

Los animales ovariectomizados tratados con gonadotropinas y hCG no mostraron cambios en la permeabilidad vascular. Este hecho confirma el origen ovárico de las isoformas 120 y 164 del VEGF y que la participación del tejido ovárico es imprescindible para el desarrollo de este síndrome. Estos mismos autores observaron que tras la unión de un inhibidor sintético (SU5416) en el receptor-2 del VEGF remitían los síntomas vasculares desencadenados por la hCG.

Posteriormente, Balasch *et al* [31] demostraron en pacientes sometidas a estimulación ovárica para un ciclo de FIV por factor masculino, que la mayor producción de VEGF se origina a nivel folicular, ratificando el origen ovárico de este factor de crecimiento. También confirmaron que el VEGF es secretado activamente tanto por las células de la granulosa luteinizadas como por los macrófagos foliculares y señalaron que esta producción aumentaba progresivamente en las primeras 48 horas tras el estímulo con hCG. Es decir, el incremento del VEGF coincide con el desarrollo relativamente inmediato del SHO precoz, tras la administración de la hCG.

Durante el SHO, no sólo se produce la secreción de esta citoquina, igualmente aumenta la expresión de su receptor-2, como ya publicaron Gómez *et al* [33]. El receptor del



VEGF incrementa la permeabilidad capilar y favorece la salida de líquido rico en proteínas al tercer espacio. También induce la proliferación de las células endoteliales y la angiogénesis *in vivo*.

Basándonos en estos trabajos, el VEGF puede ser considerado como el mediador sistémico de la hCG a través de su mecanismo de acción sobre el endotelio, y este hecho puede explicar las manifestaciones clínicas descritas en el SHO, como la **ascitis** y el **derrame pleural**. Por tanto, decidimos emplear este factor de crecimiento, junto al estradiol y la hCG como estímulos de los cultivos en monocapa HUVEC y estudiar *in vitro* su influencia sobre la modificación y secreción de la fracción soluble de la caderina EV.

#### **b) De la implicación del VEGF en el origen de la ascitis y derrame pleural durante varios procesos ováricos**

##### **Líquido peritoneal durante la ovulación**

En mujeres normovuladoras, el volumen de líquido peritoneal es mínimo al inicio de la fase proliferativa y va aumentando hasta el momento de la ovulación. Tras la ovulación, se produce un incremento brusco que persiste durante la fase lútea, disminuyendo al comienzo de la menstruación.

La angiogénesis esta implicada durante todo el ciclo ovulatorio (tanto en la fase folicular como en la fase lútea). El VEGF se produce en las células de la granulosa y en las células de la teca luteinizadas [262]. En el momento de la ovulación, con la ruptura del folículo, una gran concentración de VEGF entra en la cavidad peritoneal. También se ha demostrado la producción de VEGF en el cuerpo lúteo intensamente vascularizado tras la ovulación.

##### **Tumores malignos**

La acumulación masiva de ascitis en tumoraciones malignas intraabdominales es una causa de morbi-mortalidad en los pacientes. Son varios los procesos que pueden intervenir en la fisiopatología de esta ascitis:



- La obstrucción del drenaje linfático diafragmático por las células tumorales.
- El incremento de la angiogénesis sería el responsable, dado que se ha observado un aumento en la neovascularización peritoneal durante el desarrollo de determinados tumores. Además, determinados inhibidores de la angiogénesis reducen la formación de ascitis a través de la inhibición de la proliferación vascular.
- El aumento de la permeabilidad de los capilares del peritoneo a través de la acción del VEGF, que se ha demostrado aumentado en el líquido peritoneal de determinados tumores. Yoneda *et al* [263] demostraron que la formación de ascitis en los carcinomas de ovario esta directamente relacionada con la expresión de VEGF y la supervivencia inversamente asociada a la expresión de IL-8.

Luo *et al* [264] examinaron la expresión de VEGF en trece tumores productores de ascitis en ratón (cinco sarcomas, dos linfomas, una leucemia, un mastocitoma y un plasmocitoma) y demostraron que la forma biológicamente activa de VEGF se acumulaba en la ascitis de los trece tumores (6-850 ng/ml). Las concentraciones de VEGF eran significativamente más elevadas en los sarcomas y en los carcinomas que en los linfomas u otros tumores hematológicos ( $430 \pm 234$  vs  $19.2 \pm 10.5$  ng/ml, respectivamente). Se aislaron dos isoformas activas, la 164 y la 120 (ya comentadas en el SHO), y la menos abundante fue la 188.

También estos mismos autores comprobaron como el bloqueo con anticuerpos anti-VEGF suprime la formación de ascitis en los carcinomas y en los sarcomas, pero no tanto en los linfomas, siendo en los dos primeros en los que se había demostrado que producen mayores cantidades de VEGF. La ascitis de los linfomas y las leucemias quizás esté más relacionada con el bloqueo linfático y no tanto con el VEGF secretado en estos procesos.

Zebrowski *et al* [265] investigaron el papel del VEGF en la ascitis de 25 pacientes con carcinomas gástricos ( $n = 6$ ), de colon ( $n = 7$ ) y ovario ( $n = 12$ ) y estudiaron la permeabilidad de cultivos celulares en monocapa de HUVEC sometidos al estímulo con estos líquidos ascíticos. Estos autores confirmaron niveles elevados de VEGF en la ascitis de procesos malignos comparado con la ascitis de procesos no malignos como la cirrosis y el líquido cerebroespinal. Los niveles de VEGF en carcinoma de ovario, gástrico y de colon se incrementaron 45, 23 y 12 veces, respectivamente, comparados con los niveles



de la ascitis cirrótica. El líquido ascítico maligno de pacientes con carcinoma de colon y gástrico incrementaron la permeabilidad de los cultivos en monocapa HUVEC en todos los casos y fue neutralizada cuando se emplearon anticuerpos anti-VEGF.

La neoplasia maligna que clásicamente se caracteriza por la ascitis es el carcinoma de ovario. Los niveles intratumorales, en ascitis y séricos de VEGF están relacionados directamente con el potencial maligno del tumor como demostraron Yamamoto *et al* [266]. Las concentraciones más elevadas fueron detectadas en los tumores de células claras con invasión peritoneal. El VEGF se relaciona directamente con las tasas de supervivencia. Específicamente el 70% de las pacientes con mas de 500 ml de ascitis tenían niveles de VEGF altos en el tejido tumoral frente al 45% de las pacientes con menos de 500 ml de ascitis.

En resumen, la angiogénesis esta estrechamente relacionada con la acumulación de líquido peritoneal en varios procesos fisiológicos asociados con el ciclo ovulatorio y con el desarrollo de ascitis maligna, sobre todo en el carcinoma de ovario avanzado. El tratamiento de la ascitis de los procesos tumorales continua siendo frustrante, basado únicamente en tratamientos sintomáticos como la paracentesis y los diuréticos. Diversas terapias antiangiogénicas, basadas en la inhibición o bloqueo del VEGF, se encuentran en estudio [267, 268], y quizás puedan ser aplicadas sobre todo en aquellos casos de carcinomas de ovario sin respuesta a los tratamientos convencionales.

### **Síndrome de hiperestimulación ovárica**

Se desconoce si el origen de la ascitis en el síndrome de hiperestimulación es ovárico, peritoneal o sistémico.

Schenker *et al* [61] demostraron mediante el empleo de un colorante, que el incremento en la permeabilidad capilar a nivel de los ovarios es el responsable de la ascitis. Otros autores, como Chen *et al* [269], apoyaron esta hipótesis dado el alto contenido en hormonas como estradiol, progesterona y testosterona que se puede determinar en el líquido ascítico y en el derrame pleural en comparación con el suero, en las pacientes hiperestimuladas. Sin embargo, Yarali *et al* [60] extraperitonealizaron los ovarios de conejas en una localización subcutánea y no observaron disminución en el volumen del



líquido ascítico, tras inducir el desarrollo de un SHO. Este trabajo sugiere un origen peritoneal y no ovárico, indicando que el paso a través de la serosa extraovárica es el principal responsable de la ascitis.

Pellicer *et al* [13] demostraron que la ascitis y el derrame pleural aparecen como respuesta del sistema vascular a un mediador sistémico. El mediador de la hCG en el árbol vascular puede ser el VEGF, ya que sus niveles en plasma se elevan rápidamente tras la administración de hCG, en pacientes con riesgo de desarrollar un SHO. Esta rápida respuesta sistémica actúa directamente sobre el endotelio vascular, es decir, su mecanismo de inicio puede ser ovárico, pero en su desarrollo se implica todo el árbol vascular, favoreciendo la producción de ascitis, edema y derrame pleural. Después se perpetúa por el incremento de otras moléculas como la IL-6 y diversos esteroides gonadales, tras el estímulo crónico de la hCG o incluso del VEGF [16].

Gómez *et al* [32] estudiaron el aumento de la permeabilidad sistémica en ratas hiperestimuladas y demostraron que la presencia del ovario es imprescindible para el desarrollo del SHO, ya que las ratas ovariectomizadas no desarrollaban estos síntomas. Al igual que se demostró en el cáncer de ovario productor de ascitis, el empleo de inhibidores sintéticos del VEGF revierte los síntomas y signos en estos animales.

Todos estos trabajos apoyan la existencia de uno o varios mediadores sistémicos con capacidad para unirse y ejercer su mecanismo de acción sobre el endotelio vascular sistémico, y probablemente el más importante de todos ellos sea el VEGF. Estos factores actúan a nivel de todo el sistema vascular, dañando el endotelio y también favoreciendo los procesos trombóticos descritos en este síndrome, como por ejemplo el factor tisular de los monocitos, que se encuentra elevado en estas pacientes [270]. Por tanto, en el SHO se ve afectado todo el endotelio vascular y no sólo la vascularización ovárica o peritoneal. Se trata de una alteración de la permeabilidad generalizada, no limitada al tejido ovárico, que es el órgano inicialmente afectado durante la estimulación ovárica e inducción de la ovulación.

Basándonos en estos trabajos, decidimos estudiar como el VEGF modifica la morfología celular y afecta a la permeabilidad funcional de los cultivos en monocapa de HUVEC, a



las mismas dosis que habíamos demostrado se incrementaba la secreción de la fracción soluble de la caderina EV.

Otros autores, como Balasch *et al* [21, 23] explicaron la fisiopatología de la ascitis y derrame pleural del SHO desde otro punto de vista, no basado en la acción periférica de citoquinas procedentes del ovario. La marcada vasodilatación arteriolar periférica podría ser el evento que explicaría este síndrome. Esta vasodilatación altera la hemodinámica microvascular y la permeabilidad. Cuando se produce esta disfunción circulatoria se ponen en marcha los mecanismos vasoconstrictores endógenos y se favorece la retención de agua y sodio. Por tanto, la retención de agua y sodio es la causa de la ascitis y no la consecuencia en el SHO grave. Y esto, justificaría el empleo de fármacos natriuréticos en estas pacientes para mejorar su sintomatología.

Podemos concluir, que la fisiopatología compleja de este síndrome no nos permite explicar la sintomatología desde un único mecanismo patogénico. Quizás la participación de diversos factores y mecanismos de regulación de la circulación expliquen esta enfermedad, y lo que es más importante, nos permita diseñar la terapéutica más eficaz para contrarrestar la ascitis, el derrame pleural y la vasodilatación que ponen en peligro la vida de la paciente.

### c) Del papel del endotelio vascular en la fisiopatología del síndrome de hiperestimulación

La capa de células endoteliales de los vasos sanguíneos limita el paso de proteínas plasmáticas y células circulantes entre la sangre y los tejidos próximos [149], participando en los procesos en los que aumenta la permeabilidad vascular. Esta función es finamente regulada por dos sistemas diferentes [150]:

- El **sistema transcelular** que permite el paso de solutos plasmáticos a través del citoplasma de la célula endotelial, gracias a la acción de sistemas vesiculares regulados por organelas citoplásmicas.
- El **sistema paracelular** que controla la permeabilidad endotelial para las células circulantes y las proteínas plasmáticas, a través de las uniones intercelulares y a la matriz extracelular. Aparte de su papel en la formación de uniones, cada vez



se observa mayor evidencia que sugiere que dichas uniones pueden transferir señales celulares y ser responsables de la inhibición del crecimiento celular y la polaridad celular.

Las uniones entre las células endoteliales son estructuras complejas formadas por diferentes moléculas de adhesión [151] como las uniones comunicantes o *gap junctions*, las uniones estrechas o *tight junctions* y las uniones adherentes o *adherens junctions* (AJ). Todas estas estructuras están formadas por proteínas transmembrana específicas, en las cuales su región extracelular favorece la adhesión homotípica intercelular y su región intracitoplasmática se une al citoesqueleto.

Las AJ están situadas a lo largo de todo el árbol vascular y están formadas por proteínas transmembrana pertenecientes a la familia de las caderinas [159]. Las células endoteliales expresan una caderina específica llamada **caderina del endotelio vascular (caderina EV)** o caderina 5 [160]. Como otros miembros de esta familia, la porción intracelular se une a tres proteínas citoplasmáticas denominadas cateninas:  $\beta$ -catenina, plakoglobina y p120. La  $\beta$ -catenina y la plakoglobina se unen a la  $\alpha$ -catenina, que favorece el anclaje a **los filamentos de actina del esqueleto celular**. Aunque el dominio extracelular de la caderina EV es necesario para la adhesión celular, la asociación intracelular a las cateninas y al citoesqueleto es necesaria para la estabilización del complejo y para el control de la permeabilidad [163].

Los mecanismos responsables de la regulación de la permeabilidad vascular no están completamente aclarados. Se ha comprobado que el VEGF induce fenestraciones, las cuales podrían estar implicadas en la modulación de dicha permeabilidad. Alternativamente, el VEGF puede actuar sobre las uniones intercelulares, que limitan el flujo paracelular entre las células endoteliales [167].

La caderina EV se expresa selectivamente en las células endoteliales. Se ha demostrado su importancia en la regulación de la permeabilidad, migración y formación de nuevos vasos sanguíneos [208]. También se ha podido comprobar que la fosforilación de los residuos tirosina de la caderina EV, p120 y  $\beta$ -catenina inicia la pérdida de confluencia celular y favorecen la migración celular [166].



Previamente, se sabía que el incremento en la fosforilación de los residuos tirosina en las uniones intercelulares y en los contactos de las células endoteliales con la matriz extracelular se correlaciona con fenómenos biológicos como la migración celular, la motilidad celular y la siembra metastásica de las células tumorales [209, 210, 211].

Esser *et al* [167] demostraron por primera vez la relación entre el VEGF y la caderina EV. Sobre cultivos HUVEC, observaron un incremento significativo en la fosforilación de los residuos tirosina de diversos componentes de las uniones adherentes tras el estímulo con VEGF. En concreto, observaron esta fosforilación sobre la caderina EV,  $\beta$ -catenina, plakoglogina, p120 y PECAM. Esa fosforilación de las proteínas transmembrana se asoció con la pérdida de integridad de las uniones intercelulares.

El VEGF estimula la migración celular y la permeabilidad. Parece que la fosforilación de los residuos tirosina de la caderina EV, por parte del VEGF, puede estar directamente relacionada con los cambios que se producen en la adherencia celular durante estos procesos, y que finalmente se traducen en un incremento de la permeabilidad vascular.

El trabajo publicado por Esser *et al* [167] que relaciona directamente la acción del VEGF sobre la caderina EV, permite conocer a través de qué mecanismo celular directo se podría explicar el aumento de la permeabilidad vascular. Por tanto, en nuestro trabajo se decidió estudiar si el VEGF, que ya se había demostrado implicado en el SHO, era capaz de modificar tanto *in vitro* como *in vivo* la estructura de una proteína transmembrana como la caderina EV, una de las responsables del control de la permeabilidad endotelial.

#### **d) Del modelo *in vitro* del síndrome de hiperestimulación ovárica**

Esta investigación fue diseñada para entender los mecanismos bioquímicos y moleculares implicados en el SHO. Para ello, en una primera aproximación, se diseñó un modelo *in vitro* empleando cultivos celulares procedentes del endotelio de la vena umbilical de cordones humanos. La trascendencia de los resultados obtenidos está limitada por los siguiente factores:



- Se trata de un modelo *in vitro*.
- Las células endoteliales de cordón umbilical no están directamente implicadas en la patogénesis del síndrome de hiperestimulación.
- Los estímulos empleados en los cultivos superan las concentraciones fisiológicas.

Respecto a los cultivos celulares escogidos, el modelo ideal serían las células provenientes del endotelio de los vasos ováricos de pacientes sometidas a tratamientos de FIV [248, 271], pero se descartó este cultivo celular dada la dificultad para la reproducción de este modelo. Las células de los cultivos primarios HUVEC fueron aisladas de cordones umbilicales y este modelo ya ha sido validado por otros autores [167]. Si consideramos que todo el endotelio puede estar implicado en la patogénesis del SHO [272], podemos considerar que cultivos de HUVEC son válidos para nuestros experimentos.

La segunda crítica es el empleo de estímulos a concentraciones suprafisiológicas de estradiol, hCG y VEGF. Esto es cierto para dosis de estradiol de  $10^{-3}$  mol/L que produjeron graves alteraciones morfológicas en la monocapa, compatibles con un efecto tóxico, al igual que se observaron alteraciones celulares con concentraciones de 1000 pg/mL de VEGF. Pero esto no es así para la hCG, ya que 24 horas tras la administración de hCG se han detectado concentraciones de hCG *in vivo* entre 100 y 200 UI [261], muy próximas a los rangos empleados en los experimentos. Además, se ha observado que concentraciones superiores a 1000 pg/mL de hCG no han alterado la morfología celular en los cultivos. Por tanto, podemos deducir que el empleo de dosis suprafisiológicas no ha influido en los resultados obtenidos ya que los cultivos mantuvieron la morfología celular comparable con el cultivo control.

Además, con concentraciones más cercanas al rango fisiológico (10 pg/mL de VEGF y 100 UI/mL de hCG) ya obtuvimos diferencias significativas para la concentración secretada de la fracción soluble de la caderina EV por el cultivo HUVEC.



#### e) De la modificación de la caderina EV sometida al estímulo con $E_2$ , hCG y VEGF

Con las limitaciones previamente comentadas, se planteó estudiar el comportamiento del endotelio vascular sometido a los mismos estímulos que intervienen en el inicio y mantenimiento del SHO.

Ya se ha comprobado *in vivo* que uno de los principales factores de riesgo para el SHO es la concentración sérica de **estradiol** por encima de 3500 pg/mL [85]. Sin embargo, sólo después de la inducción de la ovulación con **hCG** se desencadenan los síntomas característicos del síndrome y se incrementa la concentración sérica de **VEGF**. El **VEGF** no proviene exclusivamente de los componentes celulares del folículo ovárico, ya que Pellicer *et al* [13] demostraron que los niveles foliculares de **VEGF** están disminuidos en pacientes con riesgo de hiperestimulación.

En primer lugar, observamos que el **estradiol**, como único estímulo, no incrementa la liberación de la fracción soluble de la caderina EV, excepto cuando se emplea una concentración tóxica ( $10^{-3}$  mol/L). Tuder *et al* [92] demostraron que durante la hipoxia celular se produce un incremento en la liberación tisular de **VEGF**. Este **VEGF**, secretado tras la hipoxia celular, puede explicar el efecto del estradiol a dosis tóxicas sobre la liberación de la caderina EV, que produce graves alteraciones en el contorno celular y en la confluencia del cultivo.

Cuando empleamos diferentes concentraciones de **hCG**, se observó un aumento en la secreción de la fracción soluble de caderina EV a partir de 100 UI/mL de hCG. Albert *et al* [16] demostraron que la hCG induce la secreción de **VEGF** y favorece la expresión del receptor-2 del **VEGF** por parte del endotelio vascular. Estas acciones se producen pocos minutos después de la adición de hCG al cultivo celular, por tanto, la hCG puede ejercer una acción indirecta sobre la caderina EV a través del **VEGF** secretado por las células del cultivo en monocapa HUVEC.

Los estímulos con diferentes concentraciones de **VEGF** produjeron un incremento significativo de la caderina EV a partir de 10 pg/mL de **VEGF**, observando graves alteraciones celulares con concentraciones de 1000 pg/mL, sugiriendo el efecto tóxico



del VEGF a dosis elevadas. Posteriormente, se comprobó el efecto aditivo que ejercen la **hCG** y el **VEGF** sobre la caderina EV. Para ello se emplearon dosis que habían demostrado no ser tóxicas y se pudo comprobar que la secreción de caderina EV es significativamente mayor cuando se emplean ambos estímulos simultáneamente.

Finalmente, se observó que el efecto producido por el VEGF sobre la liberación de la fracción soluble de caderina EV fue bloqueado tras la adición del **anticuerpo anti-VEGF**. Este bloqueo demuestra el mecanismo de acción selectivo que ejerce el VEGF sobre la caderina EV.

Estos experimentos inicialmente muestran que el VEGF ejerce una acción directa sobre el endotelio, a través de la alteración de proteínas de adhesión intercelular como la caderina del endotelio vascular. La estructura del complejo que permite la unión de esta proteína de adhesión con el citoesqueleto celular probablemente se altera, y consecuentemente se reduce la adherencia intercelular y se incrementa la permeabilidad vascular. Esto se traduce en el incremento de la fracción extracelular de la caderina EV, que nosotros podemos medir mediante ELISA en el sobrenadante del cultivo celular HUVEC. Probablemente nuevas estrategias para la prevención y el tratamiento del SHO deban prevenir la acción del VEGF sobre el endotelio vascular, neutralizando el VEGF antes de su unión a las células endoteliales o bien bloqueando sus receptores.

Se confirma que el **estradiol** no participa aisladamente en la patogénesis del SHO, ya que sólo tras el empleo de hCG y VEGF se observan cambios en la secreción de caderina EV. El estradiol, por sí sólo, no altera la estructura de la caderina EV que favorece el aumento de la permeabilidad vascular. Se ha comprobado que el SHO no se desencadena si se cancela la administración de hCG [273]. Es más, se ha visto cómo en pacientes con niveles bajos de estradiol, secundario a un déficit enzimático (la deficiencia de la enzima 17,20 desmolasa), se diagnostica el SHO con ascitis [15]. De este modo, los resultados de los experimentos *in vitro* confirman la fisiopatología del SHO descrita *in vivo* y validan el modelo celular empleado para demostrar nuestra hipótesis.

Albert *et al* [16] demostraron el papel de la **hCG** sobre el endotelio vascular. La hCG induce la expresión del receptor KDR del VEGF (receptor 2 o Flk-1). El receptor-2 está implicado en la regulación de la permeabilidad vascular, la angiogenesis y la



vasculogenesis. Se han estudiado diferentes bloqueantes del KDR en modelos animales. Estos bloqueantes reducen el tamaño tumoral y la ascitis. Aunque los mecanismos que desarrollan la ascitis sean diferentes en neoplasias y en el SHO, todavía no se había logrado impedir la ascitis en el SHO a través del sistema VEGF hasta que Gómez *et al* [32] mostraron que un bloqueante del receptor-2, el SU5416, previene los cambios vasculares en ratas hiperestimuladas.

Este receptor además transmite señales que favorecen el crecimiento celular, la quimiotaxis y la reorganización del citoesqueleto [214]. Por tanto, el aumento en la expresión de KDR tras el estímulo endotelial con hCG indica que el endotelio es sensible a esta hormona y los síntomas observados durante el SHO pueden ser secundarios a la alteración endotelial ejercida por la hCG.

Los resultados de nuestro trabajo apoyan la hipótesis de la acción ejercida por la hCG sobre las células endoteliales, probablemente a través del VEGF. Se observa un incremento en la fracción extracelular de la caderina EV, que puede justificar los cambios en la permeabilidad vascular. Este hecho puede explicar la clínica de ascitis y derrame pleural descrita en las pacientes con riesgo de hiperestimulación, tras la inducción de la ovulación con hCG.

McClure *et al* [215] demostraron que el VEGF modifica la barrera endotelial durante el SHO, incrementando la permeabilidad capilar. Kevil *et al* [274] comprobaron que el VEGF aumenta la permeabilidad a la albúmina de la monocapa endotelial y sugirieron que este hecho puede estar producido por la reorganización de las proteínas transmembrana de las uniones endoteliales como describieron otros autores [275, 276]. Maruo *et al* [277] analizaron la permeabilidad capilar inducida por la IL-6 y observaron que los filamentos de actina aparecen alineados irregularmente entre las células. Finalmente, se producía un cambio llamativo en la morfología del contorno celular y la formación de pequeños huecos o *gaps* entre células adyacentes, probablemente como consecuencia de la reorganización de los filamentos de actina.

Los resultados obtenidos por nuestro trabajo confirman la acción directa ejercida por el VEGF sobre las proteínas transmembrana responsables de la adhesión celular. Hemos



demostrado que el VEGF produce la alteración de la estructura de la caderina EV, provocando la liberación de su fracción soluble.

#### **f) De la modificación del citoesqueleto tras la alteración de la caderina EV**

La integridad del citoesqueleto de las células endoteliales es importante para mantener la competencia funcional de la barrera endotelial [278].

El aumento de la permeabilidad endotelial al agua y a los solutos depende de los siguientes factores:

1. La forma y la configuración de las células endoteliales, que está determinada por las modificaciones de determinados elementos del citoesqueleto, como los filamentos de actina [279]
2. La formación de huecos interendoteliales tras la desorganización de las proteínas presentes en las uniones transmembrana del endotelio [277].

Para demostrar estos cambios morfológicos se estudió el esqueleto celular mediante microscopía de fluorescencia. Para ello, se analizó la distribución de los filamentos de actina de los cultivos de HUVEC sometidos a los mismos estímulos que incrementan y bloquean la liberación de caderina EV.

La organización de los filamentos no se altera tras los estímulos con **estradiol** (a dosis no tóxicas), cuando se compara con el cultivo en condiciones basales. El tratamiento de la monocapa con **hCG** produce la alineación irregular de los filamentos de actina más próximos a la membrana celular y en algunas células se observan pequeños cambios del contorno probablemente secundarios a la contracción de los filamentos del citoesqueleto.

Estos cambios se acentúan en los cultivos estimulados con **VEGF** o con **VEGF y hCG**, observando alteraciones en la organización del citoesqueleto y cambios más marcados en los filamentos de actina próximos a la membrana celular. Se comprueba la separación entre las células y alteraciones en el contorno celular con la formación de huecos en la monocapa HUVEC, que había conseguido la confluencia.



Posteriormente, se investigó si los cambios producidos por el estímulo con VEGF podían ser bloqueados tras la adición del anticuerpo **anti-VEGF**. Se observó que el cultivo tratado con VEGF y anti-VEGF presenta tanto la morfología celular como la disposición de los filamentos de actina similar al cultivo control. Por tanto, los anticuerpos anti-VEGF inhiben el efecto del VEGF y demuestran que estos cambios observados son producidos exclusivamente por el VEGF y no por otros sucesos o estímulos que puedan ocurrir o intervenir durante el cultivo.

Los resultados de estos experimentos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

1. El **estradiol** por sí solo no altera la morfología de la barrera endotelial ni modifica el citoesqueleto celular, por tanto no parece responsable de los cambios en la permeabilidad observados en el SHO.
2. La **hCG** cambia la morfología endotelial y también el **VEGF** de forma aislada, pero estos cambios se hacen más evidentes cuando la monocapa es estimulada con hCG y VEGF juntos. La hCG por tanto podría ejercer su acción a través del VEGF producido por las células endoteliales.
3. El bloqueo de la acción del **VEGF** puede ser una alternativa válida para evitar los cambios producidos por el VEGF y la hCG sobre el endotelio y el aumento de la permeabilidad vascular en las pacientes hiperestimuladas.

Los resultados de este trabajo han demostrado que la hCG y el VEGF ejercen su mecanismo de acción sobre el endotelio, a través de su acción directa sobre la caderina EV, incrementando su fracción soluble en los cultivos tratados con estos dos estímulos. Tanto la hCG como el VEGF son capaces de reorganizar los filamentos de actina y alterar el citoesqueleto. Esto provoca la disminución en la adhesión celular y se favorece la formación de huecos intercelulares, que pueden estar implicados en el incremento en la permeabilidad endotelial observada en el síndrome de hiperestimulación, tanto *in vivo* como *in vitro*.



### **g) Del VEGF como responsable del incremento de la permeabilidad endotelial**

McClure *et al* [215] comprobaron que el VEGF era el responsable del aumento de la permeabilidad en el síndrome de hiperestimulación.

Nosotros hemos visto que el VEGF, a las mismas concentraciones que incrementa la fracción soluble de la caderina EV y modifica el citoesqueleto, es capaz también de aumentar la permeabilidad de la monocapa HUVEC.

En este trabajo, se ha demostrado que el VEGF incrementa hasta 20 veces más la permeabilidad de la monocapa HUVEC para la albúmina marcada con fluorescencia, cuando se compara con el cultivo en condiciones basales.

El aumento de la permeabilidad puede ser bloqueado eficazmente por los anticuerpos anti-VEGF, demostrando la especificidad del efecto del VEGF sobre la modificación de la permeabilidad en el cultivo celular.

Esta acción del VEGF sobre la permeabilidad funcional del cultivo HUVEC es significativa a las 6 horas del inicio del estímulo en los cultivos celulares y se mantiene a lo largo del tiempo. La acción ejercida por el VEGF sobre la caderina EV es, por tanto, casi inmediata y podría explicar el desencadenamiento relativamente rápido de los síntomas de hiperestimulación en las pacientes, tras la inducción de la ovulación con hCG.

Esta relación directa demostrada entre VEGF y el aumento de la permeabilidad del cultivo confirman la participación de esta citoquina en el origen y mantenimiento de los síntomas característicos del síndrome de hiperestimulación.



#### **h) De la modificación de la caderina EV en el modelo *in vivo* de hiperestimulación ovárica**

En la segunda parte de este trabajo estudiamos cómo la concentración sérica de la fracción soluble de la caderina del endotelio vascular se modifica en pacientes con el síndrome de hiperestimulación ovárica frente a un grupo de pacientes no hiperestimuladas.

Hemos comprobado que las pacientes que desarrollan el **SHO temprano grave** presentan valores séricos de caderina EV significativamente más altos y la concentración sérica más elevada coincide con el momento de mayor expresión de los síntomas clínicos de este síndrome, es decir, aproximadamente 6 días después de la punción folicular.

Esta es la primera vez que relaciona el incremento de la fracción soluble de la caderina EV con el desarrollo de los síntomas del SHO. Evidentemente, se necesitan mas estudios que corroboren estos resultados y nos permitan entender esta relación dentro de la fisiopatología del SHO. Existen además algunos detalles de este síndrome que nos pueden llevar a errores:

- Principalmente, se debería descartar la existencia de situaciones individuales que favorezcan la elevación de esta proteína de adherencia celular como la diabetes mellitus y la preeclampsia [256, 258].
- No se ha estudiado si los niveles séricos fluctúan durante el ciclo menstrual de forma fisiológica.
- Desconocemos si los tratamientos médicos empleados para estimular e inducir la ovulación favorecen la liberación de este tipo de proteínas, aunque según los resultados obtenidos en pacientes sometidas a ciclos de donación de ovocitos sin estimulación ovárica no lo parece.
- En el SHO se han descrito una serie de cambios hematológicos, como el aumento del recuento leucocitario y diversas alteraciones en la coagulación. Estos cambios pueden provocar, por sí solos, la elevación de las citoquinas circulantes y por tanto inducir la secreción de diversas proteínas transmembrana.



Es decir, la elevación sérica de la fracción soluble de la caderina EV puede ser el resultado y no la causa de los síntomas y signos clínicos característicos del SHO, como la leucocitosis.

- En este estudio se ha medido la fracción libre de la molécula, lo que no permite valorar por completo la proporción de proteína secretada y probablemente unida a proteínas transportadoras del plasma. Por eso, resulta difícil cuantificar el grado exacto de alteración que presenta el endotelio de estas pacientes hiperestimuladas.

Previamente, Daniel *et al* [53] demostraron la participación de otras moléculas de las uniones intercelulares en la fisiopatología y progresión del SHO. Para ello, determinaron los niveles plasmáticos y en líquido peritoneal de la fracción soluble de la molécula-1 de adhesión celular vascular (sVCAM-1) y la fracción soluble de la molécula-1 de adhesión intercelular (sICAM-1). Estos autores comprobaron que la concentración, tanto en plasma como en líquido peritoneal, eran significativamente mayores en las pacientes con SHO que en el grupo control. De forma similar, Abramov *et al* [52] demostraron la correlación existente entre las concentraciones plasmáticas de las proteínas sICAM-1 y selectina-E y los aspectos biológicos y clínicos del SHO grave. Los niveles de la fracción soluble de la ICAM-1 disminuyeron significativamente a medida que se produjo la mejoría clínica de los síntomas. Por el contrario, la concentración de la selectina-E alcanzó sus valores máximos durante la fase de resolución del síndrome. El significado de estos resultados no está claro, y la relación causa-efecto entre estas proteínas de adherencia celular y el SHO no puede únicamente estar basada en una correlación estadística. Se desconoce la cinética de ambas proteínas y la proporción de la fracción soluble frente a la fracción no soluble que está afectando a los tejidos implicados en este síndrome.

Estos resultados demuestran la participación de las proteínas de unión celular en la fisiopatología del SHO y las modificaciones en su estructura y función pueden explicar los síntomas desarrollados por estas pacientes, compatibles con el aumento reversible de la permeabilidad vascular. Estos hallazgos coinciden con los resultados publicados por otros autores, que sugieren la intervención de las moléculas de adherencia celular en la fisiología ovárica y su expresión tanto en el ovocito como en las células de la granulosa [280, 281]. Se ha demostrado la participación de estas moléculas durante la



foliculogénesis, ovulación, formación del cuerpo lúteo y luteólisis, todos ellos procesos reversibles. Por tanto, la fisiopatología del SHO es una manifestación clínica exagerada de todos estos eventos que se producen de forma fisiológica en el ovario.

El mecanismo final que induce el aumento de la permeabilidad vascular, por ahora, no está totalmente aclarado. Podría estar relacionado con la separación de las uniones intercelulares y los cambios observados en los filamentos de actina del citoesqueleto. O bien, la fracción soluble de la caderina EV y de otras proteínas transmembrana podría actuar como un inhibidor natural, compitiendo con las uniones celulares ya establecidas e impidiendo la función del endotelio, encargado de limitar el paso de proteínas plasmáticas y células circulantes entre la sangre y los tejidos próximos [149].

Este trabajo también ha demostrado la existencia de una correlación positiva entre la concentración sérica de caderina EV y los niveles de estradiol, el día de la aplicación de la hCG. Es decir, que a mayor nivel de estradiol sérico se miden concentraciones séricas más altas de caderina EV. Aunque los niveles de estradiol por sí solos no son suficientes para predecir la aparición del SHO, son significativamente mayores en las pacientes que desarrollan SHO comparadas con los controles [85].

Esta correlación no ha podido ser demostrada entre la concentración de caderina EV y el número de ovocitos aspirados el día de la punción. Probablemente, se deba a que las pacientes hiperestimuladas de este trabajo tuvieron una media de ovocitos recuperados de  $21,3 \pm 1,6$ , justo en el límite descrito por Ash *et al* [85] como marcador de hiperestimulación.

Por último, se valoró la posibilidad de emplear la concentración de caderina EV el día de la punción como un marcador de desarrollo de SHO, es decir, demostrar si se puede emplear como factor de riesgo que permita la identificación de pacientes que se van a hiperestimular tras la aspiración folicular. Se observó una asociación entre el valor de caderina EV en el momento de la punción y el desarrollo de SHO temprano, aunque no de forma estadísticamente significativa, quizás por el número de casos estudiados. Es decir, aunque parece que existe una tendencia no se ha podido demostrar que la determinación de caderina EV el día de la punción sirva como valor pronóstico de desarrollo de SHO temprano.



Probablemente, estudios posteriores permitan demostrar:

- El **valor real** de la caderina EV como marcador de riesgo de hiperestimulación ovárica.
- El **mejor momento** para su determinación. Se ha demostrado la relación directa existente entre el VEGF y la caderina EV, por tanto su determinación deberá coincidir con el inicio del aumento de la concentración sérica de VEGF. Se sabe que el factor desencadenante del VEGF en el endotelio vascular es la hCG, por tanto la determinación de la fracción soluble de la caderina EV deberá realizarse tras la aplicación de la hCG. Esto significa que la cuantificación sérica de la caderina EV no permitirá probablemente identificar a las pacientes de riesgo antes de la inducción de la ovulación con hCG y por tanto, antes de la aplicación del factor desencadenante del SHO.
- Su aportación al **valor predictivo positivo** alcanzado por la combinación del incremento en la concentración VEGF, el número de folículos medidos por ecografía, la apariencia ecográfica de ovarios poliquísticos y los niveles de estradiol. Agrawal *et al* [90] demostraron que estos factores por separado presentan un valor predictivo positivo más bajo que si se emplean combinados.

#### i) De la participación de la caderina EV en el SHO tardío

Como se ha comentado en la introducción de este trabajo, se describen dos patrones diferentes en el inicio del SHO: temprano, que se inicia entre los 3 a 7 días después de la administración de hCG y el tardío, que se inicia pasados de 12 a 17 días tras la administración de hCG. Esto sugiere que pueden existir dos mecanismos para la inducción del SHO.

El **SHO temprano** se produce por el efecto de la hCG exógena empleada para inducir la ovulación, y puede aparecer en pacientes que no consiguen gestación.

El **SHO tardío** se produce por la hCG endógena procedente del sincitiotrofoblasto de la gestación. Este síndrome se resuelve si la gestación se interrumpe, lo que apoya la hipótesis de la hCG endógena. Es raro que un SHO tardío se presente de manera primaria;



es más frecuente que lo haga complicando un síndrome temprano, por lo que algunos grupos han propuesto que se trata de una misma enfermedad con dos fases; la primera dependiente de la hCG ovulatoria y la segunda de la hCG producida por el trofoblasto.

Se planteó estudiar el comportamiento de la fracción soluble de la caderina EV en aquellas pacientes hiperestimuladas que consiguieron la gestación. Para ello se comprobó la persistencia de los síntomas y signos de hiperestimulación tras obtener la prueba de embarazo positiva en sangre (día +12 después de la transferencia embrionaria). Es decir, todas las pacientes incluidas en el grupo de hiperestimulación tardía, previamente habían sido diagnosticadas de síndrome de hiperestimulación temprano.

En el grupo control, se incluyeron a pacientes gestantes tras un ciclo de donación de ovocitos, es decir, cumplían la condición de gestación y su función ovárica había sido inhibida de manera transitoria tras la aplicación mensual de análogos de la GnRH. Este modelo *in vivo* permite estudiar el comportamiento de la caderina EV sistémica, ya que en estas pacientes o bien no hay función ovárica (fallo ovárico precoz, menopausia quirúrgica) o ésta es frenada farmacológicamente, para evitar la transformación secretora del endometrio previa a la transferencia embrionaria.

Aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas, sí se pudo comprobar que las pacientes que desarrollaron síntomas y signos compatibles con SHO tardío, tuvieron concentraciones séricas mayores de caderina EV que las observadas en el grupo control.

Estos resultados demuestran el papel de esta proteína transmembrana en el mantenimiento de los síntomas y signos del síndrome de hiperestimulación y apoya la teoría de que el SHO es una misma enfermedad que se desarrolla en dos fases. Para el desarrollo de la fase tardía se requiere la existencia de una gestación que perpetúe los síntomas iniciados a los pocos días de la recuperación ovocitaria, es decir, se precisa el estímulo continuado por parte de la hCG endógena generada en el trofoblasto.

La formación del trofoblasto y la invasión de la decidua se acompaña de la expresión de moléculas responsables de la adherencia celular [282]. Por tanto, durante el primer trimestre de la gestación todos los factores que favorecen la angiogénesis y



vasculogénesis embrionaria, entre ellos la hCG procedente del sinciotiotrofoblasto, probablemente favorecen el mantenimiento de los síntomas del SHO tardío.

Las vellosidades recién formadas al principio de la gestación se caracterizan por una pared gruesa que permite la invasión del trofoblasto. Pero hacia el comienzo del cuarto mes, desaparecen las células citotrofoblásticas y la pared de la vellosidad es fina, sólo formada por el endotelio vascular y el sinciotiotrofoblasto, es decir, se produce la desaparición de todos aquellos componentes celulares que pueden favorecer el estímulo y la alteración de las proteínas de adherencia endotelial, ya que la invasión trofoblástica ha sido ya completada [283].

Durante la preeclampsia, el estudio anatomopatológico de la placenta revela las lesiones endoteliales, la trasudación de los componentes del plasma al interior de las paredes vasculares, la proliferación de las células de la mioíntima y la necrosis de la media. Es decir, cuando la perfusión placentaria está comprometida por el vasoespasmo característico de esta enfermedad, los síntomas como el edema reaparecen, recordando a la clínica observada en el SHO [284]. Probablemente, la alteración de las moléculas de adhesión, secundaria al efecto de las sustancias vasoactivas secretadas durante la preeclampsia, desencadena los síntomas y signos clínicos que recuerdan al SHO.

La comparación frente a un grupo control sin función ovárica se apoya en los trabajos publicados por Gómez *et al* [32] que demostraron que los animales ovariectomizados, tratados con gonadotropinas y hCG, no desarrollaron síntomas de hiperestimulación. Por tanto, es imprescindible la presencia de función ovárica para el inicio, desarrollo y mantenimiento de la sintomatología, aunque las sustancias vasoactivas implicadas en el SHO, como el VEGF, ejercen su mecanismo de acción sobre el endotelio vascular de la serosa peritoneal [60] y sistémico [13, 16].

#### **j) De lo que está aún por investigar**

Los resultados obtenidos tras la realización de los experimentos *in vitro* sobre cultivos HUVEC y la experiencia clínica acumulada, sugieren que el endotelio, junto con la participación del ovario, son los principales tejidos responsables de los síntomas y signos observados en el SHO. Albert *et al* [16] demostraron que la hCG induce sobre el



endotelio un aumento en la secreción de VEGF y en la expresión del receptor-2 del VEGF, implicados directamente en la regulación de la permeabilidad vascular, la angiogenesis y la vasculogenesis. El bloqueo de la acción del VEGF con anticuerpos específicos previene los cambios inducidos tanto en la morfología celular y el citoesqueleto, como en el control de la permeabilidad endotelial [32]. Estos resultados permitirán el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento basadas en el proceso fisiopatológico de este síndrome y no en los tratamientos empíricos empleados hoy en día.

Los mecanismos responsables de la regulación de la permeabilidad vascular no están completamente aclarados en el SHO. Esser *et al* [167] demostraron que el VEGF induce fenestraciones en la capa endotelial, y éstas están implicadas en la modulación de la permeabilidad. Alternativamente, el VEGF modifica las uniones celulares implicadas en el control del flujo paracelular. De todas las proteínas de adhesión celular implicadas en este proceso, la caderina EV se expresa selectivamente en el endotelio [160]. Los resultados presentados en este trabajo indican que el VEGF regula la permeabilidad vascular, en parte a través de la modificación de la caderina EV. Estos cambios alteran la adhesividad celular y secundariamente se incrementa el flujo paracelular y el aumento de la permeabilidad. Por tanto, durante el SHO se eleva la concentración sérica de VEGF, la expresión endotelial de receptor-2 y se modifica la estructura de la caderina EV provocando la elevación sérica de la fracción extracelular de dicha proteína transmembrana.

Se ha demostrado que el bloqueo de esta proteína transmembrana induce apoptosis en las células endoteliales y las inhabilita para el establecimiento de conexiones con el ambiente celular que las rodea [285]. Por tanto, los esfuerzos en investigación deberán encaminarse a tratamientos que impidan la unión del VEGF al endotelio, disminuyendo la concentración sérica de VEGF mediante anticuerpos específicos o inhibidores naturales. El bloqueo ejercido directamente sobre la caderina EV puede tener consecuencias biológicas graves, como se ha demostrado tras el empleo de anticuerpos anti-caderina EV, que provocan derrame pericárdico y pulmonar [241, 175].







1. El modelo propuesto para el estudio *in vitro* de la caderina EV, que emplea células del endotelio vascular procedentes de vena de cordón umbilical humano, es un modelo válido, ya que la caderina del endotelio vascular se expresa selectivamente en las uniones homotípicas de las células endoteliales. Además, al aislar las células endoteliales de la matriz extracelular y de los componentes sanguíneos intravasculares (leucocitos, fibrina e histamina) se evita que las propiedades de las uniones intercelulares pueden estar afectadas por procesos como la inflamación o la coagulación.
2. El VEGF induce un incremento en la liberación de la fracción soluble de la caderina del endotelio vascular, *in vitro*, efecto que se ve potenciado cuando se suma el estímulo de la hCG. *Estos hallazgos permiten especular que las concentraciones elevadas de VEGF existentes en el suero de las pacientes hiperestimuladas van a modificar la estructura de las proteínas de la unión intercelular, favoreciendo el aumento de la permeabilidad vascular.*
3. El estradiol, considerado factor de riesgo pero no desencadenante del SHO, no induce la liberación de la fracción soluble de la caderina EV cuando se emplea como estímulo del cultivo primario HUVEC. *Este resultado coincide con los hallazgos observados en la clínica del síndrome de hiperestimulación ovárica, que cuando los niveles de estradiol son elevados, si no se administra hCG, generalmente no se desencadena el síndrome.*
4. El anticuerpo monoclonal anti-VEGF bloquea la liberación de la fracción soluble de la caderina EV. *Este dato abre la puerta a nuevos abordajes terapéuticos basadas en el proceso fisiopatológico de este síndrome y no en los tratamientos empíricos empleados hoy en día.*
5. El VEGF induce la liberación de la caderina del endotelio vascular, por parte del cultivo primario HUVEC, de manera casi inmediata. *Esto coincide con el inicio rápido y mantenimiento de los síntomas de hiperestimulación, que se observa a los 3 días de la administración de la hCG en pacientes con riesgo de desencadenar el SHO.*



6. El VEGF induce cambios en la morfología celular y en la organización de los filamentos de actina del esqueleto celular de la monocapa HUVEC. La morfología celular se encuentra totalmente alterada, con los filamentos de actina reorganizados y las membranas celulares contraídas, por tanto el espacio intercelular es mayor. *Esta modificación en el contorno y en esqueleto celular puede explicar el incremento de la permeabilidad vascular en pacientes hiperestimuladas.*
7. El VEGF induce un incremento significativo de la permeabilidad de la monocapa HUVEC. *Esto sugiere que, efectivamente, la interacción del VEGF con la caderina EV es capaz de poner en marcha los mecanismos que alteran la adherencia celular. Por tanto, se modifica la estructura celular, incrementándose el espacio extracelular y se produce un aumento de la permeabilidad vascular que origina la ascitis y el derrame pleural.*
8. Las pacientes que desarrollan el SHO temprano grave tiene valores séricos significativamente mayores de la fracción soluble de la caderina EV. La concentración sérica más elevada coincide con el momento de mayor expresión de los síntomas clínicos de este síndrome, es decir, aproximadamente 6 días después de la punción folicular. A partir de este momento, se inicia el descenso en la concentración de la caderina EV, coincidiendo con la mejoría clínica de las pacientes. *Esto relaciona, por primera vez, la alteración de la caderina del endotelio vascular con los síntomas del SHO como la ascitis y el derrame pleural.*
9. La liberación de la caderina EV se correlaciona significativamente con los niveles séricos de estradiol el día de administración de la hCG. *Esto confirma el valor predictivo positivo de la concentración de estradiol como factor de riesgo de desarrollo de hiperestimulación ovárica.*



10. Se ha identificado la asociación existente entre la concentración de la fracción soluble de la caderina EV el día de la punción folicular y el desarrollo del SHO temprano grave, aunque no de forma estadísticamente significativa. *Es decir, aunque parece que existe una tendencia no se ha podido demostrar que la determinación de caderina EV, el día de la punción, sirva como valor pronóstico de desarrollo de SHO temprano.*
11. Las pacientes gestantes que desarrollan el SHO tardío tienen valores séricos más elevados de la fracción soluble de la caderina del endotelio vascular, aunque de forma estadísticamente significativa. *Probablemente, futuros trabajos que amplíen el número de casos incluidos permitan demostrar la participación de la caderina EV en el mantenimiento de los síntomas iniciados tras la punción folicular y que se observan en algunas pacientes que consiguen la gestación tras un ciclo de FIV.*
12. Estos hallazgos por un lado explican en parte la importancia que tiene la caderina del endotelio vascular en la fisiopatología del síndrome de hiperestimulación, pero además pueden ayudar a diseñar nuevas estrategias terapéuticas para el síndrome de hiperestimulación mediante el bloqueo selectivo del VEGF con inhibidores, o con anticuerpos anti-VEGF, o con antagonistas del receptor del VEGF si llegamos al perfecto entendimiento de los mecanismos que inician y mantienen el desarrollo de esta enfermedad.



# CONSENTIMIENTO PARA LA PARTICIPACIÓN EN EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN TITULADO "EL PAPEL DE LA CADENA DEL ENDOTELIO VASCULAR EN LA FISIOPATOLOGÍA DEL SÍNDROME DE HIPERESTIMULACIÓN OVARIAN"

El síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO) es un síndrome que aparece en mujeres sometidas a los tratamientos de reproducción asistida, como es el caso de la fertilización in vitro, por los que se produce una gran estimulación de los ovarios, por lo que estos producen más ovocitos de los que se necesitan para la fertilización, lo que produce un exceso de estrógenos que puede dar lugar a algunos casos.

En un estudio que se va a realizar en esta clínica, vamos a realizar un proyecto de investigación en el que vamos a estudiar el papel de la cadena del endotelio vascular en la fisiopatología del síndrome de hiperestimulación ovárica. Para ello, pretendemos seleccionar un número de mujeres que estén sometidas a este tratamiento en nuestra investigación.

Queremos explicar detalladamente que esta participación supone riesgo, y de esta forma el sujeto que está participando puede tomar una decisión de si quiere o no. Aunque la participación a estas cosas supone un riesgo, nosotros vamos a hacer todo lo posible para evitar cualquier riesgo que pueda haber en esta investigación.

Igualmente, queremos explicar detalladamente que si el sujeto participa o no, no va a haber ninguna consecuencia para él, ya que si decide no participar, no va a haber ninguna consecuencia para él, y si decide participar, no va a haber ninguna consecuencia para él, ya que si decide participar, no va a haber ninguna consecuencia para él.

Donde yo, el sujeto, he leído y he entendido todo lo que se me ha explicado, y he tomado una decisión de si quiero o no participar en esta investigación, y he firmado este consentimiento.

MANIFESTAMOS que nos hemos leído detenidamente el contenido de la presente hoja de consentimiento de participación en el proyecto de investigación.

ACEPTAMOS de forma libre y voluntaria la participación en el proyecto de investigación, y me comprometo a cumplir con las condiciones que se me han explicado.

Firmado en \_\_\_\_\_, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.



## CONSENTIMIENTO PARA LA PARTICIPACIÓN EN EL PROYECTO DE INVESTIGACION TITULADO "EL PAPEL DE LA CADERINA DEL ENDOTELIO VASCULAR EN LA FISIOPATOLOGÍA DEL SÍNDROME DE HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA"

El síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO) es un cuadro que aparece en mujeres tratadas con medicamentos por su esterilidad, como es su caso. Su origen y los mecanismos por los que se produce nos son totalmente desconocidos, por lo que actualmente sólo podemos emplear medidas paliativas que pueden no ser suficientes en algunos casos.

En un intento por avanzar en nuestros conocimientos, hemos planeado un proyecto de investigación en el que pretendemos estudiar si algunas proteínas están anormalmente elevadas en la sangre de pacientes hiperestimuladas. Por ello, pretendemos solicitar su colaboración durante su proceso de tratamiento, para avanzar en nuestra investigación.

Queremos expresar claramente que sólo pretendemos extraer sangre, y de ella aislar el suero, que será utilizado para determinar el nivel de estas proteínas en él. Aunque la sometamos a estas extracciones, no necesariamente su sangre será procesada, pues serán elegidos sólo un número determinado de casos con tal fin.

Igualmente, queremos manifestarle claramente que si en algún momento usted decidiera que no desea que su material biológico fuera empleado para investigación, o usted decidiera salir del estudio, inmediatamente este sería destruido sin que por ello deban afectarse sus relaciones con el equipo médico que la trata.

Dña..... y D.....  
mayores de edad, casados, con domicilio en .....  
....., con DNI ..... y .....

MANIFESTAMOS que tras haber sido debidamente informados de la finalidad del proyecto de investigación:

ACEPTAMOS de forma libre y consciente la extracción de sangre para dicho proyecto y su utilización para el mismo.

En Madrid, a.....



## CONSENTIMIENTO PARA LA PARTICIPACIÓN EN EL PROYECTO DE INVESTIGACION TITULADO "EL PAPEL DE LA CADERINA DEL ENDOTELIO VASCULAR EN LA FISIOPATOLOGÍA DEL SÍNDROME DE HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA"

El síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO) es un cuadro que aparece en mujeres tratadas con medicamentos por su esterilidad. Su origen y los mecanismos por los que se produce nos son totalmente desconocidos, por lo que actualmente sólo podemos emplear medidas paliativas que pueden no ser suficientes en algunos casos.

En un intento por avanzar en nuestros conocimientos, hemos planeado un proyecto de investigación. Este proyecto pretende estudiar si algunas proteínas están anormalmente elevadas en cultivos celulares sometidos a los mismos estímulos que las pacientes hiperestimuladas. Por ello, pretendemos solicitar la donación del cordón umbilical con el objetivo de aislar las células que recubren el interior de la vena y poder así desarrollar los cultivos celulares necesarios para este proyecto. Su colaboración es fundamental para avanzar en nuestra investigación.

Queremos expresar claramente que sólo pretendemos extraer las células de la pared venosa (células endoteliales) y con ellas realizar los cultivos celulares. Aunque done el cordón umbilical, no necesariamente será procesado, pues serán elegidos sólo un número determinado de casos con tal fin.

Igualmente, queremos manifestarle claramente que si en algún momento usted decidiera que no desea que su material biológico fuera empleado para investigación, o usted decidiera salir del estudio, inmediatamente este sería destruido sin que por ello deban afectarse sus relaciones con el equipo médico que la trata.

Dña..... y D.....  
mayores de edad, casados, con domicilio en .....  
....., con DNI ..... y .....

MANIFESTAMOS que tras haber sido debidamente informados de la finalidad del proyecto de investigación:

DONAMOS de forma libre y consciente el cordón umbilical para dicho proyecto y su utilización para el mismo.

En Madrid, a.....



Los resultados preliminares de esta tesis doctoral fueron presentados como póster en el **XXV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF)**, obteniendo el premio al **“MEJOR PÓSTER EN INVESTIGACIÓN BÁSICA”**.

La Coruña, 13 - 15 de Mayo de 2004.

Los resultados preliminares de esta tesis doctoral fueron aceptados y presentados como comunicación oral en el **XIX Congreso de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología**.

Madrid, 29 de Junio – 2 de Julio de 2003.

Los resultados finales de esta tesis doctoral fueron aceptados y presentados como comunicación oral en el **XXI Congreso de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología**.

Copenhague, 20 – 22 de Junio de 2005.







1. **Navot D, Bergh PA, Laufer N.** Ovarian hyperstimulation syndrome in novel reproductive technologies: prevention and treatment. *Fertil Steril.* **1992**;58:249-61.
2. **Zalel Y, Katz Z, Caspi B, Ben-Hur H, Dgani R, Insler V.** Spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome concomitant with spontaneous pregnancy in a woman with polycystic ovary disease. *Am J Obstet Gynecol.* **1992**;167:122-4.
3. **Ludwig M, Gembruch U, Bauer O, Diedrich K.** Ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) in a spontaneous pregnancy with fetal and placental triploidy: information about the general pathophysiology of OHSS. *Hum Reprod.* **1998**;13:2082-7.
4. **Mancino P, Moretti S, Cocola M, Greco E, Bartolacci A, Russo R.** Hydatidiform mole. A case of hydrothorax, expression of a non-neoplastic complication. *Minerva Ginecol.* **1999**;51:103-5.
5. **Rotmensch S, Scommegna A.** Spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome associated with hypothyroidism. *Am J Obstet Gynecol.* **1989**;160:1220-2.
6. **Taher BM, Ghariabeh RA, Jarrah NS, Hadidy AM, Radaideh AM, Ajlouni KM.** Spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome caused by hypothyroidism in an adult. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* **2004**;112:107-9.
7. **Castelbaum AJ, Bigdeli H, Post KD, Freedman MF, Snyder PJ.** Exacerbation of ovarian hyperstimulation by leuprolide reveals a gonadotroph adenoma. *Fertil Steril.* **2002**;78:1311-3.
8. **Sommergruber M, Yaman C, Ebner T, Hartl J, Moser M, Tews G.** A case of ovarian hyperstimulation during pituitary down-regulation caused by plurihormonal macroadenoma. *Fertil Steril.* **2000 May**;73:1059-60.
9. **Murakami T, Higashitsuji H, Yoshinaga K, Terada Y, Ito K, Ikeda H.** Management of ovarian hyperstimulation due to follicle-stimulating hormone-secreting gonadotroph adenoma. *BJOG.* **2004**;111:1297-300.
10. **Balasch J, Carmona F, Llach J, Arroyo V, Jove I, Vanrell JA.** Acute prerenal failure and liver dysfunction in a patient with severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod.* **1990**;5:348-51.
11. **Mc Clure N, Leya J, Radwanska E, Rawlins R, Hainig RV.** Luteal phase support and sever ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod* **1992**; 7:758-64.
12. **Daya S, Gunby J.** Luteal phase support in assisted reproduction cycles. *Cochrane Database Syst Rev.* **2004**:CD004830.
13. **Pellicer A, Albert C, Mercader A, Bonilla-Musoles F, Remohí J, Simón C.** The pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome: in vivo studies investigating the role of interleukin-1beta, interleukin-6, and vascular endothelial growth factor. *Fertil Steril.* **1999**;7:482-9.
14. **Aboulghar M.** Prediction of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS). Estradiol level has an important role in the prediction of OHSS. *Hum Reprod.* **2003**;18:1140-1.
15. **Pellicer A, Miro F, Sampaio M, Gomez E, Bonilla-Musoles FM.** In vitro fertilization as a diagnostic and therapeutic tool in a patient with partial 17,20-desmolase deficiency. *Fertil Steril.* **1991**;55:970-5.
16. **Albert C, Garrido N, Mercader A, Rao CV, Remohí J, Simón C, Pellicer A.** The role of endothelial cells in the pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome. *Mol Hum Reprod.* **2002**;8:409-18.
17. **Knox GE.** Antihistamine blockade of the ovarian hyperstimulation syndrome. *Am J Obstet Gynecol.* **1974**;118:992-4.



18. **Zaidise I, Friedman M, Lindenbaum ES, Askenazi R, Peretz BA, Paldi E.** Serotonin and the ovarian hyperstimulation syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* **1983**;15:55-60.
19. **Borenstein R, Elhalah U, Lunenfeld B, Schwartz ZS.** Severe ovarian hyperstimulation syndrome: a reevaluated therapeutic approach. *Fertil Steril.* **1989**;51:791-5.
20. **Pride SM, Ho Yuen B, Moon YS.** Clinical, endocrinologic, and intraovarian prostaglandin F responses to H-1 receptor blockade in the ovarian hyperstimulation syndrome: studies in the rabbit model. *Am J Obstet Gynecol.* **1984**;148:670-4.
21. **Balasch J, Arroyo V, Carmona F, Llach J, Jimenez W, Pare JC, Vanrell JA.** Severe ovarian hyperstimulation syndrome: role of peripheral vasodilation. *Fertil Steril.* **1991**;56:1077-83.
22. **Palumbo A, Montes De Oca MJ, García LH, Martín Casañas FR, Naftolin F.** The ovarian renin-angiotensin system (OVRAS): a possible role in the pathogenesis of the ovarian hyperstimulation syndrome. En: Pellicer A, Simón C, Bonilla-Musoles F *et al* Eds. *Ovarian hyperstimulation syndrome: pathophysiology, prevention and treatment.* Sero Symposia Publications, **1999**:17-29.
23. **Balasch J, Fabregues F, Arroyo V.** Peripheral arterial vasodilation hypothesis: a new insight into the pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod.* **1998**;13:2718-30.
24. **Di Carlo C, Bruno P, Cirillo D, Morgera R, Pellicano M, Nappi C.** Increased concentrations of renin, aldosterone and Cal25 in a case of spontaneous, recurrent, familial, severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod.* **1997**;12:2115-7.
25. **Navot D, Margalioth EJ, Laufer N, Birkenfeld A, Relou A, Rosler A, Schenker JG.** Direct correlation between plasma renin activity and severity of the ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril.* **1987**;48:57-61.
26. **Teruel MJ, Carbonell LF, Llanos MC, Parrilla JJ, Abad L, Hernandez I.** Hemodynamic state and the role of angiotensin II in ovarian hyperstimulation syndrome in the rabbit. *Fertil Steril.* **2002**;77:1256-60.
27. **Ando H, Furugori K, Shibata D, Harata T, Murata Y, Mizutani S.** Dual renin-angiotensin blockade therapy in patients at high risk of early ovarian hyperstimulation syndrome receiving IVF and elective embryo cryopreservation: a case series. *Hum Reprod.* **2003**;18:1219-22.
28. **Geva E, Jaffe RB.** Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology. *Fertil Steril.* **2000**;74:429-38.
29. **Levin ER, Rosen GF, Cassidenti DL, Yee B, Meldrum D, Wisot A, Pedram A.** Role of vascular endothelial cell growth factor in Ovarian Hyperstimulation Syndrome. *J Clin Invest.* **1998**;102:1978-85.
30. **Hazzard TM, Molskness TA, Chaffin CL, Stouffer RL.** Vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiopoietin regulation by gonadotrophin and steroids in macaque granulosa cells during the peri-ovulatory interval. *Mol Hum Reprod.* **1999**;5:1115-21.
31. **Balasch J, Guimera M, Martinez-Pasarell O, Ros J, Vanrell JA, Jimenez W.** Adrenomedullin and vascular endothelial growth factor production by follicular fluid macrophages and granulosa cells. *Hum Reprod.* **2004**;19:808-14.



32. **Gomez R, Simón C, Remohí J, Pellicer A.** Vascular endothelial growth factor receptor-2 activation induces vascular permeability in hyperstimulated rats, and this effect is prevented by receptor blockade. *Endocrinology*. **2002**;143:4339-48.
33. **Gomez R, Simón C, Remohí J, Pellicer A.** Administration of moderate and high doses of gonadotropins to female rats increases ovarian vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor-2 expression that is associated to vascular hyperpermeability. *Biol Reprod*. **2003** ;68:2164-71.
34. **Verheul HM, Hoekman K, Luykx-de Bakker S, Eekman CA, Folman CC, Broxterman HJ, Pinedo HM.** Platelet: transporter of vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res*. **1997**;3:2187-90.
35. **Neulen J, Wenzel D, Hornig C.** Poor responder-high responder: the importance of soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 in ovarian stimulation protocols. *Hum Reprod* **2001**; 16: 621-6.
36. **Molskness TA, Stouffer RL, Burry KA, Gorrill MJ, Lee DM, Patton PE.** Circulating levels of free and total vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, soluble VEGF receptors-1 and -2, and angiogenin during ovarian stimulation in non-human primates and women. *Hum Reprod*. **2004**;19:822-30.
37. **Loret de Mola JR, Flores JP, Baumgardner GP, Goldfarb JM, Gindlesperger V, Friedlander MA.** Elevated interleukin-6 levels in the ovarian hyperstimulation syndrome: ovarian immunohistochemical localization of interleukin-6 signal. *Obstet Gynecol*. **1996**;87:581-7.
38. **Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GI, El Helw BA, Shaarawy M.** Elevated levels of interleukin-2, soluble interleukin-2 receptor alpha, interleukin-6, soluble interleukin-6 receptor and vascular endothelial growth factor in serum and ascitic fluid of patients with severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. **1999**;87:81-5.
39. **Ito M, Harada T, Iwabe T, Tanikawa M, Terakawa N.** Cytokine levels in a patient with severe ovarian hyperstimulation syndrome before and after the ultrafiltration and reinfusion of ascitic fluid. *J Assist Reprod Genet*. **2000**;17:118-20.
40. **Enskog A, Nilsson L, Brannstrom M.** Low peripheral blood levels of the immunosuppressive cytokine interleukin 10 (IL-10) at the start of gonadotrophin stimulation indicates increased risk for development of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS). *J Reprod Immunol*. **2001**;49:71-85.
41. **Barak V, Elchalal U, Edelstein M, Kalickman I, Lewin A, Abramov Y.** Interleukin-18 levels correlate with severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril*. **2004**;82:415-20.
42. **Gutman G, Soussan-Gutman L, Malcov M, Lessing JB, Amit A, Azem F.** Interleukin-18 is high in the serum of IVF pregnancies with ovarian hyperstimulation syndrome. *Am J Reprod Immunol*. **2004**;51:381-4.
43. **Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GI, Elhelw BA, Shaarawy M.** Elevated concentrations of angiogenin in serum and ascitic fluid from patients with severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod*. **1998**;13:2068-71.
44. **Magini A, Granchi S, Orlando C, Vannelli GB, Pellegrini S, Milani S, Grappone C, De Franco R, Susini T, Forti G, Maggi M.** Expression of endothelin-1 gene and protein in human granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab*. **1996**;81:1428-33.



45. **Fulghesu AM, Villa P, Pavone V, Guido M, Apa R, Caruso A, Lanzone A, Rossodivita A, Mancuso S.** The impact of insulin secretion on the ovarian response to exogenous gonadotropins in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* **1997**;82:644-8.
46. **Delvigne A, Kostyla K, De Leener A, Lejeune B, Cantiniaux B, Bergmann P, Rozenberg S.** Metabolic characteristics of women who developed ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod.* **2002**;17:1994-6.
47. **Salamalekis E, Makrakis E, Vitoratos N, Chassiakos D, Baka S, Creatsas G.** Insulin levels, insulin resistance, and leptin levels are not associated with the development of ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril.* **2004**;82:244-6.
48. **Ujioka T, Matsuura K, Tanaka N, Okamura H.** Involvement of ovarian kinin-kallikrein system in the pathophysiology of ovarian hyperstimulation syndrome: studies in a rat model. *Hum Reprod.* **1998**;13:3009-15.
49. **Aboulghar MA, Mansour RT.** Ovarian hyperstimulation syndrome: classifications and critical analysis of preventive measures. *Hum Reprod Update.* **2003**;9:275-89.
50. **Fabregues F, Tassies D, Reverter JC, Carmona F, Ordinas A, Balasch J.** Prevalence of thrombophilia in women with severe ovarian hyperstimulation syndrome and cost-effectiveness of screening. *Fertil Steril.* **2004**;81:989-95.
51. **Ogawa S, Minakami H, Araki S, Ohno T, Motoyama M, Shibahara H, Sato I.** A rise of the serum level of von Willebrand factor occurs before clinical manifestation of the severe form of ovarian hyperstimulation syndrome. *J Assist Reprod Genet.* **2001**;18:114-9.
52. **Abramov Y, Schenker JG, Lewin A, Kafka I, Jaffe H, Barak V.** Soluble ICAM-1 and E-selectin levels correlate with clinical and biological aspects of severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril.* **2001**;76:51-7.
53. **Daniel Y, Geva E, Amit A, Baram A, Englander T, Kupferminc MJ, Fait G, Lessing JB.** Levels of soluble vascular cell adhesion molecule-1 and soluble intercellular adhesion molecule-1 are increased in women with ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril.* **1999**;71:896-901.
54. **Ayustawati, Shibahara H, Hirano Y, Suzuki T, Takamizawa S, Suzuki M.** Serum leptin concentrations in patients with severe ovarian hyperstimulation syndrome during in vitro fertilization-embryo transfer treatment. *Fertil Steril.* **2004**;82:579-85.
55. **Manau D, Arroyo V, Jimenez W, Fabregues F, Vanrell JA, Balasch J.** Chronology of hemodynamic changes in asymptomatic in vitro fertilization patients and relationship with ovarian steroids and cytokines. *Fertil Steril.* **2002**;77:1178-83.
56. **Manau D, Balasch J, Arroyo V, Jimenez W, Fabregues F, Casamitjana R, Creus M, Vanrell JA.** Circulatory dysfunction in asymptomatic in vitro fertilization patients. Relationship with hyperestrogenemia and activity of endogenous vasodilators. *J Clin Endocrinol Metab.* **1998**;83:1489-93.
57. **Balasch J, Reverter JC, Fabregues F, Tassies D, Ordinas A, Vanrell JA.** Increased induced monocyte tissue factor expression by plasma from patients with severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril.* **1996**;66:608-13.
58. **Schenker JG, Weinstein D.** Ovarian hyperstimulation syndrome: a current survey. *Fertil Steril.* **1978**;30:255-68.



59. **Chen CD, Wu MY, Chen HF, Chen SU, Ho HN, Yang YS.** Prognostic importance of serial cytokine changes in ascites and pleural effusion in women with severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril.* **1999**;72:286-92.
60. **Yarali H, Fleige-Zahradka BG, Yuen BH, McComb PF.** The ascites in the ovarian hyperstimulation syndrome does not originate from the ovary. *Fertil Steril.* **1993**;59: 657-61.
61. **Schenker JG, Weinstein D.** Ovarian hyperstimulation syndrome: a current survey. *Fertil Steril.* **1978**;30:255-68.
62. **Golan A, Ron-el R, Herman A, Soffer Y, Weinraub Z, Caspi E.** Ovarian hyperstimulation syndrome: an update review. *Obstet Gynecol Surv.* **1989**;44:430-40.
63. **Calvo-Romero JM, Lima-Rodriguez EM.** Bilateral pleural effusion and ascites in the ovarian hyperstimulation syndrome. *Eur J Emerg Med.* **2004**;11:348-50.
64. **Fabregues F, Balasch J, Manau D, Jimenez W, Arroyo V, Creus M, Rivera F, Vanrell JA.** Haematocrit, leukocyte and platelet counts and the severity of the ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod.* **1998**;13:2406-10.
65. **Abramov Y, Elchalal U, Schenker JG.** Pulmonary manifestations of severe ovarian hyperstimulation syndrome: a multicenter study. *Fertil Steril.* **1999**;71:645-51.
66. **Baumann P, Diedrich K.** Thromboembolic complications associated with reproductive endocrinologic procedures. *Hematol Oncol Clin North Am.* **2000**;14:431-43.
67. **Levin I, Gamzu R, Hasson Y, Lessing JB, Amit A, Shapira I, Berliner S, Almog B.** Increased erythrocyte aggregation in ovarian hyperstimulation syndrome: a possible contributing factor in the pathophysiology of this disease. *Hum Reprod.* **2004**;19:1076-80.
68. **Bellver J, Simón C, Pellicer A.** Estrogen levels and thrombophilia--an intervening variable or a confounder?. *Fertil Steril.* **2002**;78:887-8.
69. **Fabregues F, Balasch J, Gines P, Manau D, Jimenez W, Arroyo V, Creus M, Vanrell JA.** Ascites and liver test abnormalities during severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Am J Gastroenterol.* **1999**;94:994-9.
70. **Zalel Y, Katz Z, Caspi B, Ben-Hur H, Dgani R, Insler V.** Spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome concomitant with spontaneous pregnancy in a woman with polycystic ovary disease. *Am J Obstet Gynecol.* **1992**;167:122-4.
71. **Ludwig M, Gembruch U, Bauer O, Diedrich K.** Ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) in a spontaneous pregnancy with fetal and placental triploidy: information about the general pathophysiology of OHSS. *Hum Reprod.* **1998**;13:2082-7.
72. **Mancino P, Moretti S, Cocola M, Greco E, Bartolacci A, Russo R.** Hydatidiform mole. A case of hydrothorax, expression of a non-neoplastic complication. *Minerva Ginecol.* **1999**;51:103-5.
73. **Ng EH, Chan CC, Tang OS, Yeung WS, Ho Pc.** Comparison of endometrial and subendometrial blood flow measured by three-dimensional power Doppler ultrasound between stimulated and natural cycles in the same patients. *Hum Reprod.* **2004**;19:2385-90.
74. **Pellicer A, Valbuena D, Cano F, Remohí J, Simón C.** Lower implantation rates in high responders: evidence for an altered endocrine milieu during the preimplantation period. *Fertil Steril.* **1996**;65:1190-5.



75. **Simón C, Dominguez F, Valbuena D, Pellicer A.** The role of estrogen in uterine receptivity and blastocyst implantation. *Trends Endocrinol Metab.* **2003**;14:197-9.
76. **Pellicer A, Dominguez F, Remohí J, Simón C.** Molecular basis of implantation. *Reprod Biomed Online.* **2002**;5 Suppl 1:44-51.
77. **Valbuena D, Martín J, de Pablo JL, Remohí J, Pellicer A, Simón C.** Increasing levels of estradiol are deleterious to embryonic implantation because they directly affect the embryo. *Fertil Steril.* **2001**;76:962-8.
78. **Pellicer A, Simón C.** Relationships in medicine--causal vs. casual. *Fertil Steril.* **1999**;72:188-90.
79. **Simón C, Cano F, Valbuena D, Remohí J, Pellicer A.** Clinical evidence for a detrimental effect on uterine receptivity of high serum oestradiol concentrations in high and normal responder patients. *Hum Reprod* **1995**;10: 2432-7.
80. **Simón C, García-Velasco JA, Valbuena D, Peinado JA, Moreno C, Remohí J, Pellicer A.** Increasing uterine receptivity by decreasing estradiol levels during the preimplantation period in high responders with the use of a follicle-stimulating hormone step-down regimen. *Fertil Steril.* **1998**;70:234-9.
81. **Cano F, García-Velasco JA, Millet A, Remohí J, Simón C, Pellicer A.** Oocyte quality in polycystic ovaries revisited: identification of a particular subgroup of women. *J Assist Reprod Genet.* **1997**;14:254-61.
82. **Fabregues F, Penarrubia J, Vidal E, Casals G, Vanrell JA, Balasch J.** Oocyte quality in patients with severe ovarian hyperstimulation syndrome: a self-controlled clinical study. *Fertil Steril.* **2004**;82:827-33.
83. **Enskog A, Henriksson M, Unander M, Nilsson L, Brannstrom M.** Prospective study of the clinical and laboratory parameters of patients in whom ovarian hyperstimulation syndrome developed during controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization. *Fertil Steril.* **1999**;71:808-14.
84. **Crooke AC.** Induction of ovulation with gonadotrophins. *Br Med Bull.* **1970**;26:17-21.
85. **Asch RH, Li HP, Balmaceda JP, Weckstein LN, Stone SC.** Severe ovarian hyperstimulation syndrome in assisted reproductive technology: definition of high risk groups. *Hum Reprod.* **1991**;6:1395-9.
86. **Mathur RS, Akande AV, Keay SD, Hunt LP, Jenkins JM.** Distinction between early and late ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril.* **2000**;73:901-7.
87. **Delvigne A, Vandromme J, Demeestere I, Leroy F.** Unpredictable cases of complicated ovarian hyperstimulation in IVF. *Int J Fertil Womens Med.* **1997**;42:268-70.
88. **Fulghesu AM, Villa P, Pavone V, Guido M, Apa R, Caruso A, Lanzzone A, Rossodivita A, Mancuso S.** The impact of insulin secretion on the ovarian response to exogenous gonadotropins in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* **1997**;82:644-8.
89. **Kamat BR, Brown LF, Manseau EJ, Senger DR, Dvorak HF.** Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human granulosa and theca lutein cells. Role in corpus luteum development. *Am J Pathol.* **1995**;146:157-65.



90. Agrawal R, Tan SL, Wild S, Sladkevicius P, Engmann L, Payne N, Bekir J, Campbell S, Conway G, Jacobs H. Serum vascular endothelial growth factor concentrations in *in vitro* fertilization cycles predict the risk of ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril*. 1999;71:287-93.
91. Agrawal R, Jacobs H, Payne N, Conway G. Concentration of vascular endothelial growth factor released by cultured human luteinized granulosa cells is higher in women with polycystic ovaries than in women with normal ovaries. *Fertil Steril*. 2002;78:1164-9.
92. Tudor RM, Flook BE, Voelkel NF. Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. Modulation of gene expression by nitric oxide. *J Clin Invest*. 1995;95:1798-807.
93. Artini PG, Fasciani A, Monti M, Luisi S, D'Ambrogio G, Genazzani AR. Changes in vascular endothelial growth factor levels and the risk of ovarian hyperstimulation syndrome in women enrolled in an *in vitro* fertilization program. *Fertil Steril*. 1998;70:560-4.
94. Daelemans C, Smits G, de Maertelaer V, Costagliola S, Englert Y, Vassart G, Delbaere A. Prediction of severity of symptoms in iatrogenic ovarian hyperstimulation syndrome by follicle-stimulating hormone receptor Ser680Asn polymorphism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:6310-5.
95. Endo T, Honnma H, Hayashi T, Chida M, Yamazaki K, Kitajima Y, Azumaguchi A, Kamiya H, Kudo R. Continuation of GnRH agonist administration for 1 week, after hCG injection, prevents ovarian hyperstimulation syndrome following elective cryopreservation of all pronucleate embryos. *Hum Reprod*. 2002;17:2548-51.
96. Abdala HI, Ah-Moye M, Brinsden P. The effect of the dose of hCG and the type gonadotropin stimulation on oocyte recovery rates in an IVF program. *Fertil Steril*. 1987;48:958-63.
97. Forman RG, Frydman R, Egan D, Ross C, Barlow DH. Severe ovarian hyperstimulation syndrome using agonists of gonadotropin-releasing hormone for *in vitro* fertilization: a European series and a proposal for prevention. *Fertil Steril*. 1990;53:502-9.
98. Al-Shawaf T, Zosmer A, Hussain S, Tozer A, Panay N, Wilson C, Lower AM, Grudzinski JG. Prevention of severe ovarian hyperstimulation syndrome in IVF with or without ICSI and embryo transfer: a modified 'coasting' strategy based on ultrasound for identification of high-risk patients. *Hum Reprod*. 2001;16:24-30.
99. Isaza V, García-Velasco JA, Aragonés M, Remohí J, Simón C, Pellicer A. Oocyte and embryo quality after coasting: the experience from oocyte donation. *Hum Reprod*. 2002;17:1777-82.
100. Ulug U, Bahceci M, Erden HF, Shalev E, Ben-Shlomo I. The significance of coasting duration during ovarian stimulation for conception in assisted fertilization cycles. *Hum Reprod*. 2002;17:310-3.
101. Ulug U, Ben-Shlomo I, Bahceci M. Predictors of success during the coasting period in high-responder patients undergoing controlled ovarian stimulation for assisted conception. *Fertil Steril*. 2004;82:338-42.
102. Moreno L, Diaz I, Pacheco A, Zuniga A, Requena A, García-Velasco JA. Extended coasting duration exerts a negative impact on IVF cycle outcome due to premature luteinization. *Reprod Biomed Online*. 2004;9:500-4.



103. **Delvigne A, Rozenberg S.** Preventive attitude of physicians to avoid OHSS in IVF patients. *Hum Reprod.* **2001**;16:2491-5.
104. **Tozer AJ, Iles RK, Iammarrone E, Gillott CM, Al-Shawaf T, Grudzinskas JG.** The effects of 'coasting' on follicular fluid concentrations of vascular endothelial growth factor in women at risk of developing ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod.* **2004**;19:522-8.
105. **García-Velasco JA, Zuñiga A, Pacheco A, Gomez R, Simón C, Remohí J, Pellicer A.** Coasting acts through downregulation of VEGF gene expression and protein secretion. *Hum Reprod.* **2004**;19:1530-8.
106. **Fluker MR, Hooper WM, Yuzpe AA.** Withholding gonadotropins ("coasting") to minimize the risk of ovarian hyperstimulation during superovulation and in vitro fertilization-embryo transfer cycles. *Fertil Steril.* **1999**;71:294-301.
107. **Egbase PE, Makhseed M, Al Sharhan M, Grudzinskas JG.** Timed unilateral ovarian follicular aspiration prior to administration of human chorionic gonadotrophin for the prevention of severe ovarian hyperstimulation syndrome in in-vitro fertilization: a prospective randomized study. *Hum Reprod.* **1997**;12:2603-6.
108. **Tomazevic T, Meden-Vrtovec H.** Early timed follicular aspiration prevents severe ovarian hyperstimulation syndrome. *J Assist Reprod Genet.* **1996**;13:282-6.
109. **Le Du A, Kadoch IJ, Bourcigaux N, Doumerc S, Bourrier MC, Chevalier N, Fanchin R, Chian RC, Tachdjian G, Frydman R, Frydman N.** In vitro oocyte maturation for the treatment of infertility associated with polycystic ovarian syndrome: the French experience. *Hum Reprod.* **2005**;20:420-424.
110. **Chian RC.** In-vitro maturation of immature oocytes for infertile women with PCOS. *Reprod Biomed Online.* **2004**;8:547-52.
111. **Orvieto R, Ben-Rafael Z.** Role of intravenous albumin in the prevention of severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod.* **1998** ;13:3306-9.
112. **Bellver J, Munoz EA, Ballesteros A, Soares SR, Bosch E, Simón C, Pellicer A, Remohí J.** Intravenous albumin does not prevent moderate-severe ovarian hyperstimulation syndrome in high-risk IVF patients: a randomized controlled study. *Hum Reprod.* **2003**;18:2283-8.
113. **Baron JF.** Pharmacology of low molecular weight hydroxyethyl starch. *Ann Fr Anesth Reanim.* **1992**;11:509-15.
114. **Konig E, Bussen S, Sutterlin M, Steck T.** Prophylactic intravenous hydroxyethyle starch solution prevents moderate-severe ovarian hyperstimulation in in-vitro fertilization patients: a prospective, randomized, double-blind and placebo-controlled study. *Hum Reprod.* **1998**;13:2421-4.
115. **Abramov Y, Fatum M, Abrahamov D, Schenker JG.** Hydroxyethyl starch versus human albumin for the treatment of severe ovarian hyperstimulation syndrome: a preliminary report. *Fertil Steril.* **2001**;75:1228-30.
116. **Awonuga AO, Dean N, Zaidi J, Pittrof RU, Bekir JS, Tan SL.** Outcome of frozen embryo replacement cycles following elective cryopreservation of all embryos in women at risk of developing ovarian hyperstimulation syndrome. *J Assist Reprod Genet.* **1996**;13:293-7.
117. **Shaker AG, Zosmer A, Dean N, Bekir JS, Jacobs HS, Tan SL.** Comparison of intravenous albumin and transfer of fresh embryos with cryopreservation of all embryos for subsequent transfer in prevention of ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril.* **1996**;65:992-6.



118. **Zelinski-Wooten MB, Hutchison JS, Hess DL, Wolf DP, Stouffer RL.** A bolus of recombinant human follicle stimulating hormone at midcycle induces periovulatory events following multiple follicular development in macaques. *Hum Reprod.* **1998**;13:554-60.
119. **Gomez R, Lima I, Simón C, Pellicer A.** Administration of low-dose LH induces ovulation and prevents vascular hyperpermeability and vascular endothelial growth factor expression in superovulated rats. *Reproduction.* **2004**;127:483-9.
120. **European Recombinant LH Study Group.** Human recombinant luteinizing hormone is as effective as, but safer than, urinary human chorionic gonadotropin in inducing final follicular maturation and ovulation in *in vitro* fertilization procedures: results of a multicenter double-blind study. *J Clin Endocrinol Metab.* **2001**;86:2607-18.
121. **Manau D, Fabregues F, Arroyo V, Jimenez W, Vanrell JA, Balasch J.** Hemodynamic changes induced by urinary human chorionic gonadotropin and recombinant luteinizing hormone used for inducing final follicular maturation and luteinization. *Fertil Steril.* **2002**;78:1261-7.
122. **Shalev E, Geslevich Y, Ben-Ami M.** Induction of pre-ovulatory luteinizing hormone surge by gonadotrophin-releasing hormone agonist for women at risk for developing the ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod.* **1994**;9:417-9.
123. **Kol S.** Luteolysis induced by a gonadotropin-releasing hormone agonist is the key to prevention of ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* **2004**;81:1-5.
124. **Fauser BC, de Jong D, Olivennes F, Wramsby H, Tay C, Itskovitz-Eldor J, van Hooren HG.** Endocrine profiles after triggering of final oocyte maturation with GnRH agonist after cotreatment with the GnRH antagonist ganirelix during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab.* **2002**;87:709-15.
125. **Balasch J, Tur R, Creus M, Buxaderas R, Fabregues F, Ballesca JL, Barri PN, Vanrell JA.** Triggering of ovulation by a gonadotropin releasing hormone agonist in gonadotropin-stimulated cycles for prevention of ovarian hyperstimulation syndrome and multiple pregnancy. *Gynecol Endocrinol.* **1994**;8:7-12.
126. **Morris RS, Karande VC, Dudkiewicz A, Morris JL, Gleicher N.** Octreotide is not useful for clomiphene citrate resistance in patients with polycystic ovary syndrome but may reduce the likelihood of ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril.* **1999**;71:452-6.
127. **Coccia ME, Comparetto C, Bracco GL, Scarselli G.** GnRH antagonists. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* **2004**;115:44-56
128. **García-Velasco JA, Isaza V, Vidal C, Landazabal A, Remohí J, Simón C, Pellicer A.** Human ovarian steroid secretion in vivo: effects of GnRH agonist versus antagonist (cetorelix). *Hum Reprod.* **2001**;16:2533-9.
129. **Gal M, Eldar-Geva T, Margalioth EJ, Barr I, Orly J, Diamant YZ.** Attenuation of ovarian response by low-dose ketoconazole during superovulation in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* **1999**;72:26-31.



130. **Parsanezhad ME, Alborzi S, Pakniat M, Schmidt EH.** A double-blind, randomized, placebo-controlled study to assess the efficacy of ketoconazole for reducing the risk of ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* **2003**;80:1151-5.
131. **Rimington MR, Walker SM, Shaw RW.** The use of laparoscopic ovarian electrocautery in preventing cancellation of in-vitro fertilization treatment cycles due to risk of ovarian hyperstimulation syndrome in women with polycystic ovaries. *Hum Reprod*. **1997**;12:1443-7.
132. **Bellver J, Escudero E, Pellicer A.** Bilateral partial oophorectomy in the management of severe ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS): ovarian mutilating surgery is not an option in the management of severe OHSS. *Hum Reprod*. **2003**;18:1363-7.
133. **Balasch J, Fabregues F, Arroyo V, Jimenez W, Creus M, Vanrell JA.** Treatment of severe ovarian hyperstimulation syndrome by a conservative medical approach. *Acta Obstet Gynecol Scand*. **1996**;75:662-7.
134. **Maslovitz S, Jaffa A, Eytan O, Wolman I, Many A, Lessing JB, Gamzu R.** Renal blood flow alteration after paracentesis in women with ovarian hyperstimulation. *Obstet Gynecol*. **2004**;104:321-6.
135. **Al-Ramahi M, Leader A, Claman P, Spence J.** A novel approach to the treatment of ascites associated with ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod*. **1997**;12:2614-6.
136. **Abuzeid MI, Nassar Z, Massaad Z, Weiss M, Ashraf M, Fakh M.** Pigtail catheter for the treatment of ascites associated with ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod*. **2003**;18:370-3.
137. **Koike T, Araki S, Minakami H, Ogawa S, Sayama M, Shibahara H, Sato I.** Clinical efficacy of peritoneovenous shunting for the treatment of severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod*. **2000**;15:113-7.
138. **Endo T, Kitajima Y, Hayashi T, Fujii M, Hata H, Azumaguchi A.** Low-molecular-weight dextran infusion is more effective for the treatment of hemoconcentration due to severe ovarian hyperstimulation syndrome than human albumin infusion. *Fertil Steril*. **2004**;82:1449-51.
139. **Kodama H, Fukuda J, Karube H, Matsui T, Shimizu Y, Tanaka T.** Characteristics of blood hemostatic markers in a patient with ovarian hyperstimulation syndrome who actually developed thromboembolism. *Fertil Steril*. **1995**;64:1207-9.
140. **Ferraretti AP, Gianaroli L, Diotallevi L, Festi C, Trounson A.** Dopamine treatment for severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod*. **1992**;7:180-3.
141. **Tsunoda T, Shibahara H, Hirano Y, Suzuki T, Fujiwara H, Takamizawa S, Ogawa S, Motoyama M, Suzuki M.** Treatment for ovarian hyperstimulation syndrome using an oral dopamine prodrug, docarpamine. *Gynecol Endocrinol*. **2003**;17:281-6.
142. **Reed AP, Tausk H, Reynolds H.** Anesthetic considerations for severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Anesthesiology*. **1990**;73:1275-7.
143. **Papanikolaou EG, Tournaye H, Verpoest W, Camus M, Vernaev V, Van Steirteghem A, Devroey P.** Early and late ovarian hyperstimulation syndrome: early pregnancy outcome and profile. *Hum Reprod*. **2005**;20:636-41.



144. **Abramov Y, Elchalal U, Schenker JG.** Obstetric outcome of in vitro fertilized pregnancies complicated by severe ovarian hyperstimulation syndrome: a multicenter study. *Fertil Steril.* **1998**;70:1070-6.
145. **Wiser A, Levron J, Kreizer D, Achiron R, Shrim A, Schiff E, Dor J, Shulman A.** Outcome of pregnancies complicated by severe ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS): a follow-up beyond the second trimester. *Hum Reprod.* **2004**; 23:1643-8.
146. **Pellicer A, Simón C.** Relationships in medicine--causal vs. casual. *Fertil Steril.* **1999** ;72:188-90.
147. **De Neubourg D, Mangelschots K, Van Royen E, Vercruyssen M, Gerris J.** Singleton pregnancies are as affected by ovarian hyperstimulation syndrome as twin pregnancies. *Fertil Steril.* **2004** Dec;8:1691-3.
148. **Orvieto R.** Can we eliminate severe ovarian hyperstimulation syndrome?. *Hum Reprod.* **2005**;20:320-2.
149. **Simionescu M, Simionescu N.** Endothelial transport of macromolecules: transcytosis and endocytosis. A look from cell biology. *Cell Biol Rev.* **1991**;25:5-78.
150. **Lum H, Malik AB.** Regulation of vascular endothelial barrier function. *Am J Physiol.* **1994**;267:L223-41.
151. **Dejana E.** Endothelial adherens junctions: implications in the control of vascular permeability and angiogenesis. *J Clin Invest.* **1996**;98:1949-53.
152. **Gumbiner BM.** Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell.* **1996**;84:345-57.
153. **Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S.** Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol.* **1993**;123:1777-88.
154. **Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S.** Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol.* **1998**;141:1539-50.
155. **Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E.** Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol.* **1998**;142:117-27.
156. **Anderson JM, Van Itallie CM.** Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am J Physiol.* **1995**;269:G467-75.
157. **Dejana E, Corada M, Lampugnani MG.** Endothelial cell-to-cell junctions. *FASEB J.* **1995**;9:910-8.
158. **Feng D, Nagy JA, Pyne K, Dvorak HF, Dvorak AM.** Ultrastructural localization of platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1, CD31) in vascular endothelium. *J Histochem Cytochem.* **2004**;52:87-101.
159. **Takeichi M.** Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol.* **1993**;5:806-11.
160. **Lampugnani MG, Resnati M, Raiteri M, Pigott R, Pisacane A, Houen G, Ruco LP, Dejana E.** A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J Cell Biol.* **1992**;118:1511-22.
161. **Vincent PA, Xiao K, Buckley KM, Kowalczyk AP.** VE-cadherin: adhesion at arm's length. *Am J Physiol Cell Physiol.* **2004**;286:987-97.



162. **Iyer S, Ferreri DM, DeCocco NC, Minnear FL, Vincent PA.** VE-cadherin-p120 interaction is required for maintenance of endothelial barrier function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **2004**;286:1143-53.
163. **Navarro P, Caveda L, Breviario F, Mandoteanu I, Lampugnani MG, Dejana E.** Catenin-dependent and -independent functions of vascular endothelial cadherin. *J Biol Chem.* **1995**;270:30965-72.
164. **Angst BD, Marcozzi C, Magee AI.** The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J Cell Sci.* **2001**;114:629-41.
165. **Gao X, Kouklis P, Xu N, Minshall RD, Sandoval R, Vogel SM, Malik AB.** Reversibility of increased microvessel permeability in response to VE-cadherin disassembly. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **2000**;279:L1218-25.
166. **Lampugnani MG, Corada M, Andriopoulou P, Esser S, Risau W, Dejana E.** Cell confluence regulates tyrosine phosphorylation of adherens junction components in endothelial cells. *J Cell Sci.* **1997**;110:2065-77.
167. **Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E, Risau W.** Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci.* **1998**;111:1853-65.
168. **Majno G, Palade GE.** Studies on inflammation. I. The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopic study. *J Biophys Biochem Cytol.* **1961**;11:571-605.
169. **Majno G, Palade GE, Schoefl GI.** Studies on inflammation. II. The site of action of histamine and serotonin along the vascular tree: a topographic study. *J Biophys Biochem Cytol.* **1961**;11:607-26.
170. **Rabiet MJ, Plantier JL, Rival Y, Genoux Y, Lampugnani MG, Dejana E.** Thrombin-induced increase in endothelial permeability is associated with changes in cell-to-cell junction organization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **1996**;16:488-96.
171. **Rabiet MJ, Plantier JL, Dejana E.** Thrombin-induced endothelial cell dysfunction. *Br Med Bull.* **1994**;50:936-45.
172. **Guo M, Wu MH, Granger HJ, Yuan SY.** Transference of recombinant VE-cadherin cytoplasmic domain alters endothelial junctional integrity and porcine microvascular permeability. *J Physiol.* **2004**;554:78-88.
173. **Shaw SK, Bamba PS, Perkins BN, Lusinskas FW.** Real-time imaging of vascular endothelial-cadherin during leukocyte transmigration across endothelium. *J Immunol.* **2001**;167:2323-30.
174. **Dong QG, Bernasconi S, Lostaglio S, De Calmanovici RW, Martin-Padura I, Breviario F, Garlanda C, Ramponi S, Mantovani A, Vecchi A.** A general strategy for isolation of endothelial cells from murine tissues. Characterization of two endothelial cell lines from the murine lung and subcutaneous sponge implants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **1997**;17:1599-604.
175. **Corada M, Mariotti M, Thurston G, Smith K, Kunkel R, Brockhaus M, Lampugnani MG, Martin-Padura I, Stoppacciaro A, Ruco L, McDonald DM, Ward PA, Dejana E.** Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1999**;96:9815-20.
176. **Peyrieras N, Hyafil F, Louvard D, Ploegh HL, Jacob F.** Uvomorulin: a nonintegral membrane protein of early mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1983**;80:6274-7.



177. **Nose A, Nagafuchi A, Takeichi M.** Isolation of placental cadherin cDNA: identification of a novel gene family of cell-cell adhesion molecules. *EMBO J.* **1987**;6:3655-61.
178. **Christofori G, Semb H.** The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci.* **1999**;24:73-6.
179. **Yap AS, Brieher WM, Pruschy M, Gumbiner BM.** Lateral clustering of the adhesive ectodomain: a fundamental determinant of cadherin function. *Curr Biol.* **1997**;7:308-15.
180. **Navarro P, Ruco L, Dejana E.** Differential localization of VE- and N-cadherins in human endothelial cells: VE-cadherin competes with N-cadherin for junctional localization. *J Cell Biol.* **1998**;140:1475-84.
181. **Corada M, Liao F, Lindgren M, Lampugnani MG, Breviario F, Frank R, Muller WA, Hicklin DJ, Bohlen P, Dejana E.** Monoclonal antibodies directed to different regions of vascular endothelial cadherin extracellular domain affect adhesion and clustering of the protein and modulate endothelial permeability. *Blood.* **2001**;97:1679-84.
182. **Yap AS, Niessen CM, Gumbiner BM.** The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn. *J Cell Biol.* **1998**;141:779-89.
183. **Kowalczyk AP, Navarro P, Dejana E, Bornslaeger EA, Green KJ, Kopp DS, Borgwardt JE.** VE-cadherin and desmoplakin are assembled into dermal microvascular endothelial intercellular junctions: a pivotal role for plakoglobin in the recruitment of desmoplakin to intercellular junctions. *J Cell Sci.* **1998**;111:3045-57.
184. **Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Compernelle V, Bono F, Balconi G, Spagnuolo R, Oostuyse B, Dewerchin M, Zanetti A, Angellilo A, Mattot V, Nuyens D, Lutgens E, Clotman F, de Ruiter MC, Gittenberger-de Groot A, Poelmann R, Lupu F, Herbert JM, Collen D, Dejana E.** Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell.* **1999**;98:147-57.
185. **Gory-Faure S, Prandini MH, Pointu H, Roullot V, Pignot-Paintrand I, Vernet M, Huber P.** Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis. *Development.* **1999**;126:2093-102.
186. **Ukropec JA, Hollinger MK, Salva SM, Woolkalis MJ.** SHP2 association with VE-cadherin complexes in human endothelial cells is regulated by thrombin. *J Biol Chem.* **2000**;275:5983-6.
187. **Zeitvogel A, Baumann R, Starzinski-Powitz A.** Identification of an invasive, N-cadherin-expressing epithelial cell type in endometriosis using a new cell culture model. *Am J Pathol.* **2001**;159:1839-52.
188. **Caveda L, Martin-Padura I, Navarro P, Breviario F, Corada M, Gulino D, Lampugnani MG, Dejana E.** Inhibition of cultured cell growth by vascular endothelial cadherin (cadherin-5/VE-cadherin). *J Clin Invest.* **1996**;98:886-93.
189. **Matsumura T, Wolff K, Petzelbauer P.** Endothelial cell tube formation depends on cadherin 5 and CD31 interactions with filamentous actin. *J Immunol.* **1997**;158:3408-16.
190. **Amagai M.** Autoimmunity against desmosomal cadherins in pemphigus. *J Dermatol Sci.* **1999**;20:92-102.



191. **Amagai M, Matsuyoshi N, Wang ZH, Andl C, Stanley JR.** Toxin in bullous impetigo and staphylococcal scalded-skin syndrome targets desmoglein 1. *Nat Med.* **2000**;6:1275-7.
192. **Rickman L, Simrak D, Stevens HP, Hunt DM, King IA, Bryant SP, Eady RA, Leigh IM, Arnemann J, Magee AI, Kelsell DP, Buxton RS.** N-terminal deletion in a desmosomal cadherin causes the autosomal dominant skin disease striate palmoplantar keratoderma. *Hum Mol Genet.* **1999**;8:971-6.
193. **Hakimelahi S, Parker HR, Gilchrist AJ, Barry M, Li Z, Bleackley RC, Pasdar M.** Plakoglobin regulates the expression of the anti-apoptotic protein BCL-2. *J Biol Chem.* **2000**;275:10905-11.
194. **Wu Q, Maniatis T.** A striking organization of a large family of human neural cadherin-like cell adhesion genes. *Cell.* **1999**;97:779-90.
195. **Shapiro L, Colman DR.** The diversity of cadherins and implications for a synaptic adhesive code in the CNS. *Neuron.* **1999**;23:427-30.
196. **Telo' P, Breviario F, Huber P, Panzeri C, Dejana E.** Identification of a novel cadherin (vascular endothelial cadherin-2) located at intercellular junctions in endothelial cells. *J Biol Chem.* **1998**;273:17565-72.
197. **Usui T, Shima Y, Shimada Y, Hirano S, Burgess RW, Schwarz TL, Takeichi M, Uemura T.** Flamingo, a seven-pass transmembrane cadherin, regulates planar cell polarity under the control of Frizzled. *Cell.* **1999**;98:585-95.
198. **Cox B, Hadjantonakis AK, Collins JE, Magee AI.** Cloning and expression throughout mouse development of *mfat1*, a homologue of the *Drosophila* tumour suppressor gene *fat*. *Dev Dyn.* **2000**;217:233-40.
199. **Doyle DD, Goings GE, Upshaw-Earley J, Page E, Ranscht B, Palfrey HC.** T-cadherin is a major glycoposphoinositol-anchored protein associated with noncaveolar detergent-insoluble domains of the cardiac sarcolemma. *J Biol Chem.* **1998**;273:6937-43.
200. **Kools P, Van Imschoot G, van Roy F.** Characterization of three novel human cadherin genes (*CDH7*, *CDH19*, and *CDH20*) clustered on chromosome 18q22-q23 and with high homology to chicken cadherin-7. *Genomics.* **2000**;68:283-95.
201. **Schwab SG, Eckstein GN, Hallmayer J, Lerer B, Albus M, Borrmann M, Lichtermann D, Ertl MA, Maier W, Wildenauer DB.** Evidence suggestive of a locus on chromosome 5q31 contributing to susceptibility for schizophrenia in German and Israeli families by multipoint affected sib-pair linkage analysis. *Mol Psychiatry.* **1997**;2:156-60.
202. **Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z.** Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* **1999**;13:9-22.
203. **Watkins RH, D'Angio CT, Ryan RM, Patel A, Maniscalco WM.** Differential expression of VEGF mRNA splice variants in newborn and adult hyperoxic lung injury. *Am J Physiol* **1999**;276:858-67.
204. **Olson TA, Mohanraj D, Carson LF, Ramakrishnan S.** Vascular permeability factor gene expression in normal and neoplastic human ovaries. *Cancer Res.* **1994**;54:276-80.
205. **Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A.** Different signal transduction properties of KDR and Flt 1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* **1994**;269:2698-95.
206. **Calera MR, Venkatakrishnan A, Kazlauskas A.** VE-cadherin increases the half-life of VEGF receptor 2. *Exp Cell Res.* **2004**;300:248-56.



207. **Abedi H, Zachary I.** Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells. *J Biol Chem.* **1997**;272:15442-51.
208. **Breviario F, Caveda L, Corada M, Martin-Padura I, Navarro P, Golay J, Introna M, Gulino D, Lampugnani MG, Dejana E.** Functional properties of human vascular endothelial cadherin (7B4/cadherin-5), an endothelium-specific cadherin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **1995**;15:1229-39.
209. **Volberg T, Geiger B, Dror R, Zick Y.** Modulation of intercellular adherens-type junctions and tyrosine phosphorylation of their components in RSV-transformed cultured chick lens cells. *Cell Regul.* **1991**;2:105-20.
210. **Kinch MS, Clark GJ, Der CJ, Burridge K.** Tyrosine phosphorylation regulates the adhesions of ras-transformed breast epithelia. *J Cell Biol.* **1995**;130:461-71.
211. **Takeda H, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Behrens J, Birchmeier W, Tsukita S.** V-src kinase shifts the cadherin-based cell adhesion from the strong to the weak state and beta catenin is not required for the shift. *J Cell Biol.* **1995**;131:1839-47.
212. **Lambeng N, Wallez Y, Rampon C, Cand F, Christe G, Gulino-Debrac D, Vilgrain I, Huber P.** Vascular Endothelial-Cadherin Tyrosine Phosphorylation in Angiogenic and Quiescent Adult Tissues. *Circ Res.* **2005**;96:384-91.
213. **Plouet J, Moukadiri H.** Characterization of the receptor to vasculotropin on bovine adrenal cortex-derived capillary endothelial cells. *J Biol Chem.* **1990**;265:22071-4.
214. **Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH.** Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* **1994**;269:26988-95.
215. **McClure N, Healy DL, Rogers PA.** Vascular endothelial cell growth factor as permeability agent in ovarian hyperstimulation syndrome. *Lancet* **1994**;344:235-6.
216. **Tsukita S, Oishi K, Akiyama T, Yamanashi Y, Yamamoto T, Tsukita S.** Specific proto-oncogenic tyrosine kinases of src family are enriched in cell-to-cell adherens junctions where the level of tyrosine phosphorylation is elevated. *J Cell Biol.* **1991**;113:867-79.
217. **Weis S, Cui J, Barnes L, Cheresh D.** Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis. *J Cell Biol.* **2004**;167:223-9.
218. **Kendall RL, Wang G, Thomas KA.** Identification of natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, flt-1 and its heterodimerization with KDR. *Biochem Biophys Res Commun* **1996**;226:324-8.
219. **Winter MC, Shasby SS, Ries DR, Shasby DM.** Histamine selectively interrupts VE-cadherin adhesion independently of capacitive calcium entry. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **2004**;287:816-23.
220. **Andriopoulou P, Navarro P, Zanetti A, Lampugnani MG, Dejana E.** Histamine induces tyrosine phosphorylation of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **1999**;19:2286-97.
221. **Goeckeler ZM, Wysolmerski RB.** Myosin light chain kinase-regulated endothelial cell contraction: the relationship between isometric tension, actin polymerization, and myosin phosphorylation. *J Cell Biol.* **1995**;130:613-27.



222. **Moy AB, Van Engelenhoven J, Bodmer J, Kamath J, Keese C, Giaever I, Shasby S, Shasby DM.** Histamine and thrombin modulate endothelial focal adhesion through centripetal and centrifugal forces. *J Clin Invest.* **1996**;97:1020-7.
223. **Gardner TW, Leshner T, Khin S, Vu C, Barber AJ, Brennan WA Jr.** Histamine reduces ZO-1 tight-junction protein expression in cultured retinal microvascular endothelial cells. *Biochem J.* **1996**;320:717-21.
224. **Ribes JA, Francis CW, Wagner DD.** Fibrin induces release of von Willebrand factor from endothelial cells. *J Clin Invest.* **1987**;79:117-23.
225. **Bach TL, Barsigian C, Chalupowicz DG, Busler D, Yaen CH, Grant DS, Martinez J.** VE-Cadherin mediates endothelial cell capillary tube formation in fibrin and collagen gels. *Exp Cell Res.* **1998**;238:324-34.
226. **Martinez J, Ferber A, Bach TL, Yaen CH.** Interaction of fibrin with VE-cadherin. *Ann N Y Acad Sci.* **2001**;936:386-405.
227. **Noden DM.** Origins and assembly of avian embryonic blood vessels. *Ann N Y Acad Sci.* **1990**;588:236-49.
228. **Risau W, Flamme I.** Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **1995**;11:73-91.
229. **Coffin JD, Harrison J, Schwartz S, Heimark R.** Angioblast differentiation and morphogenesis of the vascular endothelium in the mouse embryo. *Dev Biol.* **1991**;148:51-62.
230. **Vittet D, Buchou T, Schweitzer A, Dejana E, Huber P.** Targeted null-mutation in the vascular endothelial-cadherin gene impairs the organization of vascular-like structures in embryoid bodies. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1997**;94:6273-8.
231. **Albelda SM, Buck CA.** Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J.* **1990**;4:2868-80.
232. **Folkman J.** How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue?. *Cancer Res.* **1986**;46:467-73.
233. **Gordon JD, Shifren JL, Foulk RA, Taylor RN, Jaffe RB.** Angiogenesis in the human female reproductive tract. *Obstet Gynecol Surv.* **1995**;50:688-97.
234. **Klagsbrun M, Moses MA.** Molecular angiogenesis. *Chem Biol.* **1999**;6:217-24.
235. **Rabascio C, Muratori E, Mancuso P, Calleri A, Raia V, Foutz T, Cinieri S, Veronesi G, Pruneri G, Lampertico P, Iavarone M, Martinelli G, Goldhirsch A, Bertolini F.** Assessing tumor angiogenesis: increased circulating VE-cadherin RNA in patients with cancer indicates viability of circulating endothelial cells. *Cancer Res.* **2004**;64:4373-7.
236. **Folkman J, Klagsbrun M.** Angiogenic factors. *Science.* **1987**;235:442-7.
237. **Klagsbrun M, D'Amore PA.** Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* **1996**;7:259-70.
238. **Shibuya M, Luo JC, Toyoda M, Yamaguchi S.** Involvement of VEGF and its receptors in ascites tumor formation. *Cancer Chemother Pharmacol.* **1999**;43:72-7.
239. **O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J.** Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell.* **1997**;88:277-85.
240. **Hendrix MJ, Seftor EA, Meltzer PS, Gardner LM, Hess AR, Kirschmann DA, Schattelman GC, Seftor RE.** Expression and functional significance of VE-cadherin in aggressive human melanoma cells: role in vasculogenic mimicry. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2001**;98:8018-23.



241. **Liao F, Li Y, O'Connor W, Zanetta L, Bassi R, Santiago A, Overholser J, Hooper A, Mignatti P, Dejana E, Hicklin DJ, Bohlen P.** Monoclonal antibody to vascular endothelial-cadherin is a potent inhibitor of angiogenesis, tumor growth, and metastasis. *Cancer Res.* **2000**;60:6805-10.
242. **Prewett M, Huber J, Li Y, Santiago A, O'Connor W, King K, Overholser J, Hooper A, Pytowski B, Witte L, Bohlen P, Hicklin DJ.** Antivascular endothelial growth factor receptor (fetal liver kinase 1) monoclonal antibody inhibits tumor angiogenesis and growth of several mouse and human tumors. *Cancer Res.* **1999**;59:5209-18.
243. **Liao F, Doody JF, Overholser J, Finnerty B, Bassi R, Wu Y, Dejana E, Kussie P, Bohlen P, Hicklin DJ.** Selective targeting of angiogenic tumor vasculature by vascular endothelial-cadherin antibody inhibits tumor growth without affecting vascular permeability. *Cancer Res.* **2002**;62:2567-75.
244. **Corada M, Zanetta L, Orsenigo F, Breviario F, Lampugnani MG, Bernasconi S, Liao F, Hicklin DJ, Bohlen P, Dejana E.** A monoclonal antibody to vascular endothelial-cadherin inhibits tumor angiogenesis without side effects on endothelial permeability. *Blood.* **2002**;100:905-11.
245. **Carson DA, Ribeiro JM.** Apoptosis and disease. *Lancet.* **1993**;341:1251-4.
246. **Re F, Zanetti A, Sironi M, Polentarutti N, Lanfranccone L, Dejana E, Colotta F.** Inhibition of anchorage-dependent cell spreading triggers apoptosis in cultured human endothelial cells. *J Cell Biol.* **1994**;127:537-46.
247. **Brancolini C, Benedetti M, Schneider C.** Microfilament reorganization during apoptosis: the role of Gas2, a possible substrate for ICE-like proteases. *EMBO J.* **1995**;14:5179-90.
248. **Ratcliffe KE, Anthony FW, Richardson MC, Stones RW.** Morphology and functional characteristics of human ovarian microvascular endothelium. *Hum Reprod.* **1999**;14:1549-54.
249. **Herren B, Levkau B, Raines EW, Ross R.** Cleavage of beta-catenin and plakoglobin and shedding of VE-cadherin during endothelial apoptosis: evidence for a role for caspases and metalloproteinases. *Mol Biol Cell.* **1998**;9:1589-601.
250. **Otero K, Martínez F, Beltrán A, Gonzalez D, Herrera B, Quintero G, Delgado R, Rojas A.** Albumin-derived advanced glycation end-products trigger the disruption of the vascular endothelial Cadherin complex in cultured human and murine endothelial cells. *Biochem J* **2001**; 359:567-4.
251. **Miyata T, Hori O, Zhang J, Yan SD, Ferran L, Iida Y, Schmidt AM.** The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a central mediator of the interaction of AGE-beta2microglobulin with human mononuclear phagocytes via an oxidant-sensitive pathway. Implications for the pathogenesis of dialysis-related amyloidosis. *J Clin Invest.* **1996**;98:1088-94.
252. **Davidson MK, Russ PK, Glick GG, Hoffman LH, Chang MS, Haselton FR.** Reduced expression of the adherens junction protein cadherin-5 in a diabetic retina. *Am J Ophthalmol.* **2000**;129:267-9.
253. **Soeki T, Tamura Y, Shinohara H, Sakabe K, Onose Y, Fukuda N.** Elevated concentration of soluble vascular endothelial cadherin is associated with coronary atherosclerosis. *Circ J.* **2004**;68:1-5.



254. **Pellegrino M, Furmaniak-Kazmierczak E, LeBlanc JC, Cho T, Cao K, Marcovina SM, Boffa MB, Cote GP, Koschinsky ML.** The apolipoprotein(a) component of lipoprotein(a) stimulates actin stress fiber formation and loss of cell-cell contact in cultured endothelial cells. *J Biol Chem.* **2004**;279:6526-33.
255. **Christodoulakos G, Lambrinoudaki I, Panoulis C, Papadias C, Economou E, Creatsas G.** Effect of hormone therapy and raloxifene on serum VE-cadherin in postmenopausal. *Fertil Steril.* **2004**;82:634-8.
256. **Babawale MO, Lovat S, Mayhew TM, Lammiman MJ, James DK, Leach L.** Effects of gestational diabetes on junctional adhesion molecules in human term placental vasculature. *Diabetologia.* **2000**;43:1185-96.
257. **Leach L, Gray C, Staton S, Babawale MO, Gruchy A, Foster C, Mayhew TM, James DK.** Vascular endothelial cadherin and beta-catenin in human fetoplacental vessels of pregnancies complicated by Type 1 diabetes: associations with angiogenesis and perturbed barrier function. *Diabetologia* **2004**;47:695-709.
258. **Wang Y, Gu Y, Granger DN, Roberts JM, Alexander JS.** Endothelial junctional protein redistribution and increased monolayer permeability in human umbilical vein endothelial cells isolated during preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* **2002**;186:214-20.
259. **Wang Y, Lewis DF, Gu Y, Zhang Y, Alexander JS, Granger DN.** Placental trophoblast-derived factors diminish endothelial barrier function. *J Clin Endocrinol Metab.* **2004**;89:2421-8.
260. **Lambeng N, Wallez Y, Rampon C, Cand F, Christe G, Gulino-Debrac D, Vilgrain I, Huber P.** Vascular Endothelial-Cadherin Tyrosine Phosphorylation in Angiogenic and Quiescent Adult Tissues. *Circ Res.* **2005**;96:384-91.
261. **De los Santos MJ, Tarin JJ, Gomez E, Remohí J, Pellicer A.** Daily measurements and in-vitro effects of human chorionic gonadotrophin in the early luteal phase. *Hum Reprod.* **1993**;8:2047-51.
262. **Kamat BR, Brown LF, Manseau EJ, Senger DR, Dvorak HF.** Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human granulosa and theca lutein cells. Role in corpus luteum development. *Am J Pathol.* **1995**;146:157-65.
263. **Yoneda J, Kuniyasu H, Crispens MA, Price JE, Bucana CD, Fidler IJ.** Expression of angiogenesis-related genes and progression of human ovarian carcinomas in nude mice. *J Natl Cancer Inst.* **1998**;90:447-54.
264. **Luo JC, Yamaguchi S, Shinkai A, Shitara K, Shibuya M.** Significant expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in mouse ascites tumors. *Cancer Res.* **1998**;58:2652-60.
265. **Zebrowski BK, Liu W, Ramirez K, Akagi Y, Mills GB, Ellis LM.** Markedly elevated levels of vascular endothelial growth factor in malignant ascites. *Ann Surg Oncol.* **1999**;6:373-8.
266. **Yamamoto S, Konishi I, Tsuruta Y, Nanbu K, Mandai M, Kuroda H, Matsushita K, Hamid AA, Yura Y, Mori T.** Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) during folliculogenesis and corpus luteum formation in the human ovary. *Gynecol Endocrinol.* **1997**;11:371-81.
267. **Luo JC, Toyoda M, Shibuya M.** Differential inhibition of fluid accumulation and tumor growth in two mouse ascites tumors by an antivascular endothelial growth factor/permeability factor neutralizing antibody. *Cancer Res.* **1998**;58:2594-600.



268. **Mesiano S, Ferrara N, Jaffe RB.** Role of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer: inhibition of ascites formation by immunoneutralization. *Am J Pathol.* **1998**;153:1249-56.
269. **Chen CD, Wu MY, Chen HF, Chen SU, Ho HN, Yang YS.** Prognostic importance of serial cytokine changes in ascites and pleural effusion in women with severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril.* **1999**;72:286-92.
270. **Balasch J, Reverter JC, Fabregues F, Tassies D, Ordinas A, Vanrell JA.** Increased induced monocyte tissue factor expression by plasma from patients with severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril.* **1996**;66:608-13.
271. **Davis JS, Rueda BR, Spanel-Borowski K.** Microvascular endothelial cells of the corpus luteum. *Reprod Biol Endocrinol.* **2003**;1:89.
272. **Katayama T, Kusanagi Y, Kiyomura M, Ochi H, Ito M.** Leukocyte behaviour and permeability in the rat mesenteric microcirculation following induction of ovulation. *Hum Reprod.* **2003**;18:1179-84.
273. **Copperman AB, Horowitz GM, Kaplan P, Scott RT, Navot D, Hofmann GE.** Relationship between circulating human chorionic gonadotropin levels and premature luteinization in cycles of controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril.* **1995**;63:1267-71.
274. **Kevil CG, Payne DK, Mire E, Alexander JS.** Vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor-mediated permeability occurs through disorganization of endothelial junctional proteins. *J Biol Chem.* **1998**;273:15099-103.
275. **Liu B, Earl HM, Baban D, Shoaibi M, Fabra A, Kerr DJ, Seymour LW.** Melanoma cell lines express VEGF receptor KDR and respond to exogenously added VEGF. *Biochem Biophys Res Commun.* **1995**;217:721-7.
276. **Bates DO, Lodwick D, Williams B.** Vascular endothelial growth factor and microvascular permeability. *Microcirculation.* **1999**;6:83-96.
277. **Maruo N, Morita I, Shirao M, Murota S.** IL-6 increases endothelial permeability in vitro. *Endocrinology.* **1992**;131:710-4.
278. **Suttorp N, Kastle S, Neuhof H.** Glutathione redox cycle is an important defense system of endothelial cells against chronic hyperoxia. *Lung.* **1991**;169:203-14.
279. **Malik AB, Lynch JJ, Cooper JA.** Endothelial barrier function. *J Invest Dermatol.* **1989**;93:62-7.
280. **Vigano P, Gaffuri B, Ragni G, Di Blasio AM, Vignali M.** Intercellular adhesion molecule-1 is expressed on human granulosa cells and mediates their binding to lymphoid cells. *J Clin Endocrinol Metab.* **1997**;82:101-5.
281. **Campbell S, Swann HR, Seif MW, Kimber SJ, Aplin JD.** Cell adhesion molecules on the oocyte and preimplantation human embryo. *Hum Reprod.* **1995**;10:1571-8.
282. **Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, Damsky CH.** Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion?. *J Clin Invest.* **1997**;99:2139-51.
283. **Sadler TW.** Membranas fetales y placenta. En: *Langman Embriología Médica.* Editorial Médica Panamericana S.A., **1986**:98-115.
284. **Cunningham FG, MacDonald PC, Gant NF, Leveno KJ, Gilstrap LC.** Trastornos hipertensivos del embarazo. En: *Williams Obstetricia.* Masson S.A., **1996**:753-806.



285. **Prewett M, Huber J, Li Y, Santiago A, O'Connor W, King K, Overholser J, Hooper A, Pytowski B, Witte L, Bohlen P, Hicklin DJ.** Antivascular endothelial growth factor receptor (fetal liver kinase 1) monoclonal antibody inhibits tumor angiogenesis and growth of several mouse and human tumors. *Cancer Res.* **1999**;59:5209-18.

